



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA ESTER FROTA FERNANDES

**ESTUDO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS SM-2 E SM-3 OBTIDOS DE
ESTEMODINA EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE DOR NA ATM DE RATOS**

SOBRAL
2020

MARIA ESTER FROTA FERNANDES

ESTUDO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS SM-2 E SM-3 OBTIDOS DE
ESTEMODINA EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE DOR NA ATM DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Inflamação e Dor.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Hellíada Vasconcelos Chaves.

MARIA ESTER FROTA FERNANDES

ESTUDO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS SM-2 E SM-3 OBTIDOS DE
ESTEMODINA EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE DOR NA ATM DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Inflamação e Dor.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Hellíada Vasconcelos Chaves.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* de Sobral

Prof.^a Dr.^a Hellíada Vasconcelos Chaves (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* de Sobral

Prof.^a Dr.^a Mirna Marques Bezerra (Membro interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* de Sobral

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa (Membro externo)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Fortaleza

A Deus por toda proteção.

À minha família, em especial aos meus pais,
Raimundinha e Fernandes, por todo incentivo,
amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças, saúde, paz de espírito e por me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais, Raimundinha e Fernandes, por sempre investirem no meu saber, por todo amor, por serem meu abrigo e minha fortaleza, por sempre me dedicarem um amor incondicional.

Aos meus irmãos, Reginaldo, Wellington e Gladstone, por todas palavras de incentivo e cumplicidade.

Ao meu noivo, Alan Ponte, por toda compreensão, amor e carinho ao longo dessa jornada.

Ao professor Vicente de Paulo Teixeira Pinto por todo apoio e dedicação à Ciência, por todo esforço em desenvolver projetos de pesquisa.

À Professora Hellíada Vasconcelos Chaves, por, desde o início da graduação, ser uma inspiração de profissional e de ser humano, por ser luz em nossas vidas, por aceitar me orientar nesse caminho da Ciência, com inúmeros ensinamentos valiosos, minha eterna gratidão.

À Professora Mirna Marques Bezerra por toda atenção, sabedoria, leveza e zelo com que conduz as pesquisas, sempre sendo um porto seguro no Laboratório de Farmacologia de Sobral-LAFS, com orientações enriquecedoras.

Aos membros da banca por terem aceite ao convite, por sua disponibilidade e considerações.

À Danielle do Val, por todo incentivo, ensinamento e acolhida no LAFS, desde o início da iniciação científica.

Ao amigo Felipe Dantas, por todo apoio ao longo do mestrado, por todo conhecimento compartilhado, sempre disposto a ajudar mesmo longe fisicamente.

À amiga Larissa Queiroz, por toda ajuda ao longo da pesquisa e por todos os momentos de descontração.

Aos alunos de Iniciação Científica do LAFS (ICs), que se tornaram amigos queridos, Manoel Vieira, Andressa, Tiago, Sarah, Luize, Pedro Fontenele, Pedro Wherton, Sebastião, Ariely. Agradeço por todo apoio, sempre disponíveis a ajudar, por toda torcida, incentivo e dedicação à pesquisa.

À toda equipe do Laboratório de Farmacologia de Sobral pelos momentos de colaboração e descontração.

Às amigas da pós-graduação Bruna Prado, Germana, Luzia Hermínia, Trycia, Tamara e Stefany que tornaram essa caminhada mais leve.

À Nayara, técnica do Laboratório de Farmacologia de Sobral – LaFS, por sua disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos ao longo dessa jornada.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI por todo o suporte para a confecção do material histológico.

À professora Dra. Karuza Maria Alves Pereira pela valiosa contribuição nas análises histopatológicas, pela disponibilidade, atenção e sugestões no processamento para confecção das lâminas histológicas.

À Flávia de Araújo Silva, técnica do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI, por sua disponibilidade em contribuir com este trabalho na confecção das peças histológicas e por toda atenção dedicada.

Ao Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO)- UFC, por todas as parcerias em pesquisas.

À Alana Gondinho, veterinária do biotério da UFC, por ser incrível como profissional e pessoa, por todo seu amor dedicado ao seu trabalho que transparece em forma de carinho e por toda ajuda em ajustes no projeto de pesquisa.

À Jordânia Marques por toda disponibilidade, ajuda e zelo com que desenvolve seu trabalho.

Ao Anderson Weyne, técnico do laboratório de histologia-UFC, por toda dedicação, desempenho e compromisso com seu trabalho e por sua alegria que contagia.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À CAPES, ao CNPQ e à FUNCAP pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma torceram e contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa e meu crescimento pessoal.

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo, mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(JOSÉ DE ALENCAR)

RESUMO

Disfunção Temporomandibular (DTM) refere-se a um conjunto de distúrbios funcionais que manifesta um largo espectro de problemas clínicos. A *Stemodia maritima* Linn é uma planta utilizada no Nordeste brasileiro em diversas aplicações terapêuticas. Análogos obtidos através de processos químicos combinatórios de constituintes de plantas estão desempenhando um importante papel na descoberta de novos fármacos, que podem auxiliar na terapêutica da dor na ATM. Nesse sentido, este estudo teve por objetivo investigar a segurança, a eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória de dois compostos semissintético, SM-2 e SM-3, derivados da estemodina (SM-1), isolada das folhas da *Stemodia maritima* Linn, em um modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. Para avaliação da toxicidade aguda, camundongos machos (*Mus musculus*; n=5) (25-30 g), receberam, em jejum, SM-2 (10 µg/kg; v.o.), SM-3 (10 µg/kg; v.o.) ou solução salina 0,9%, sendo em sequência observados por um período de 24 h, em intervalos de tempo. Para avaliar a toxicidade subcrônica os camundongos foram observados por 15 minutos ao dia, após administração das soluções, durante 14 dias consecutivos. No 15º dia foi realizada a eutanásia para avaliação de parâmetros bioquímicos e análise histopatológica dos órgãos. Para análise da hipernocicepção inflamatória foram utilizados ratos *Wistar* machos (180-240g), no qual os grupos foram pré-tratados por via oral (v.o.), com solução salina (0,9%), SM-2 (1; 10µg/kg) ou SM-3 (1; 10µg/kg). Após 60 minutos, foi aplicada injeção intra-articular (i.a.) de solução salina (50 µL, 0,9%) ou formalina (50 µL, 1,5%) na ATM, em seguida o comportamento nociceptivo foi avaliado por 45 min. Ademais, foi investigado o possível envolvimento das vias da hemeoxigenase-1 (HO-1) e do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação antinociceptiva do SM-2 e do SM-3. O comprometimento da atividade motora foi avaliado pelo teste *rotarod*. Os compostos SM-2 e SM-3 durante 14 dias não alteraram a variação ponderal, o peso relativo dos órgãos, parâmetros bioquímicos e histológicos em relação ao grupo controle salina. SM-2 e SM-3 apresentaram efeitos antinociceptivos através da redução (p<0,05) da resposta nociceptiva comportamental, quando comparado ao grupo formalina, não apresentando envolvimento das vias HO-1 e NO em seu mecanismo de ação. Não ocorreram alterações motoras no teste *rotarod*, não apresentaram toxicidade e se mostraram eficazes em reduzir a hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos, sendo necessárias novas pesquisas para investigar os mecanismos de ação destes semissintéticos.

Palavras-chave: Articulação temporomandibular, nocicepção, toxicidade, *Stemodia maritima*.

ABSTRACT

Temporomandibular Disorder (TMD) refers to a set of functional disorders that manifests a wide spectrum of clinical problems. *Stemodia maritima* Linn is a plant that is used in several therapies in Northeast Brazil. Analogs obtained through combinatorial chemical processes of plant constituents are playing an important role in the discovery of new drugs, that can help in the treatment of TMJ pain. In this sense, this study aimed to investigate the safety, antinociceptive and anti-inflammatory efficacy of two semi-synthetic compounds, SM-2 and SM-3, derived from estemodin (SM-1), isolated from leaves of *Stemodia maritima* Linn, in a model of formalin-induced inflammatory hypernociception in rat TMJ. To evaluate the acute toxicity, male mice (*Mus musculus*; n=5) (25-30 g) received, in fasting state, SM-2 (10 µg/kg; po), SM-3 (10 µg/kg; po) or 0.9% saline solution, being observed in sequence for a period of 24 h, at time intervals. To assess the subchronic toxicity of mice, they were observed for 15 minutes a day, after administration of the solutions, for 14 consecutive days. On the 15th day, euthanasia was performed to evaluate biochemical parameters and histopathological analysis of the organs. For the analysis of inflammatory hypernociception, male Wistar rats (180-240g) were used, in which the groups were pre-treated orally (o.r), with saline solution (0.9%), SM-2 (1; 10µg/kg) or SM-3 (1; 10µg/kg). After 60 minutes, an intra-articular (i.a.) injection of saline solution (50 µL, 0.9%) or formalin (50 µL, 1.5%) was applied into the TMJ, then the nociceptive behavior was evaluated for 45 min. Furthermore, the possible involvement of the hemeoxygenase-1 (HO-1) and nitric oxide (NO) pathways in the antinociceptive action mechanism of SM-2 and SM-3 was investigated. Impairment of motor activity was assessed by the rotarod test. The SM-2 SM-3 compounds during 14 days did not change weight variation, relative organ weight, biochemical and histological parameters in relation to the saline control group. SM-2 and SM-3 showed antinociceptive effects through the reduction ($p < 0.05$) of the behavioral nociceptive response, when compared to the formalin group, not involving the HO-1 and NO pathways in their mechanism of action. There were no motor changes in the rotarod test, they did not present toxicity and were effective in reducing formalin-induced hypernociception in the TMJ of rats, requiring further research to investigate the mechanisms of action of these semi-synthetics.

Keywords: Temporomandibular joint, nociception, toxicity, *Stemodia maritima*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da via sensitiva principal da região facial.....	19
Figura 2. Foto de <i>Stemodia maritima</i> Linn.	29
Figura 3. Estruturas dos esqueletos estemodano	30
Figura 4. Estrutura de aphidicolina	31
Figura 5. Caixa espelhada de observação do comportamento.....	39
Figura 6. Equipamento para o Teste de <i>Rotarod</i>	43
Figura 7. Taxa de sobrevivência dos animais no ensaio de segurança de SM-2 e SM-3.....	45
Figura 8. Variação ponderal em camundongos tratados com SM-2 (10 µg/kg) ou SM-3 (10 µg/kg) durante 14 dias consecutivos.	47
Figura 9. Efeito de SM-2 e SM-3 na resposta nociceptiva induzida por formalina 1,5% na ATM de ratos.....	50
Figura 10. Envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva dos compostos semissintéticos SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos.).	51
Figura 11. Envolvimento do NO na atividade antinociceptiva de SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos.....	52
Figura 12. Efeito da administração aguda de SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg) em ratos submetidos ao teste <i>Rotarod</i> (tempo de latência).....	53
Figura 13. Efeito da administração aguda de SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg) em ratos submetidos ao teste <i>Rotarod</i> (número de quedas).....	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Número total de mortes no ensaio de segurança de SM-2 e SM-3.	46
Tabela 2: Alterações comportamentais relativas dos animais no ensaio de segurança, toxicidade subcrônica de SM-2 e SM-3.	46
Tabela 3: Níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT), asparto aminotransferase (AST) em soro de camundongos machos (<i>Mus musculus</i>) tratados com SM-2 e SM-3 por 14 dias.....	48
Tabela 4: Efeito da administração (v.o) com SM-2 (10 µg/kg) ou SM-3 (10 µg/kg) durante 14 dias sobre os pesos relativos dos órgãos de camundongos machos (<i>Mus musculus</i>).	48
Tabela 5: Efeito do tratamento com SM-2 e SM-3 na análise histopatológica (H & E) do estômago, fígado e rim.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

± SEM:	Mais ou menos o erro padrão da média
°C:	Grau Celsius
µg:	Micrograma
µl:	Microlitro
AINES:	Anti-Inflamatórios não esteroidais
ALT:	Alanina aminotransferase
ANOVA:	Análise de Variância
AST:	Aspartato aminotransferase
ATM:	Articulação Temporomandibular
ATP:	Trifosfato de adenosina
BVD:	Biliverdina
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO:	Monóxido de carbono
DC-TMD:	Critério de diagnóstico para disfunção temporomandibular
DTM:	Disfunção temporomandibular
FUNCAP:	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g:	Gramma
GMPc/cGMP:	Monofosfato cíclico de guanosina
HO-1:	Hemeoxigenase-1
i.art:	Intra-articular
i.p:	Intraperitoneal
i.v.:	Intravenoso
ICAM-1:	Molécula de adesão intercelular 1
INCT- IBSAB:	Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro
iNOS:	Óxido nítrico sintetase induzível
K⁺_{ATP}:	Canal de potássio sensível ao ATP
LAFS:	Laboratório de Farmacologia de Sobral
mg:	Miligrama

mg/kg:	Miligrama por quilo
n:	Número da amostra
NaCl:	Cloreto de Sódio
nm:	Namômetro
NO:	Óxido Nítrico
OPPERA:	Avaliação Prospectiva e Avaliação de Risco
per.os.:	Via oral
p<0,05:	Probabilidade de erro estatístico 5%
RPM:	Rotações por minuto
s.c.:	Subcutânea
s:	Segundos
SNC:	Sistema Nervoso Central
SNP:	Sistema Nervoso Periférico
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences
TNF-α:	Fator de necrose tumoral alfa
v.o.:	Via oral
ZnPP-IX:	Zinco protoporfirina-IX
RDC-TMD:	Critério de Diagnóstico em Pesquisa para DTM

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Dor Orofacial	17
2.2 Disfunção Temporomandibular (DTM)	20
2.3 Vias de regulação endógena na inflamação da ATM	23
2.3.1 Heme-oxigenase-1	23
2.3.2 Óxido Nitrico (NO)	25
2.4 Modelo de dor inflamatória na ATM induzida por formalina.....	27
2.5 Gênero <i>Stemodia</i>	28
2.5.1 <i>Stemodia marítima</i> Linn.	28
2.6 Metabólitos secundários e derivados semissintéticos	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral.....	33
4.2 Objetivos Específicos.....	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Modelo Animal e princípios bioéticos.....	34
5.2 Compostos semissintéticos SM-2 e SM-3.....	34
5.3 Estudo da toxicidade <i>in vivo</i> do SM-2 e SM-3.....	35
5.4 Delineamento Experimental	36
5.4.1 Avaliação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos	36
5.4.2 Injeções intra-articulares	37
5.4.3 Testes comportamentais para a avaliação da resposta nociceptiva induzida pela <i>Formalina</i>	38

5.4.4 Avaliação do envolvimento da via HO-1 no efeito antinociceptivo de dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3) na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM	39
5.4.4.1 Drogas utilizadas para avaliação do envolvimento da via HO-1	39
5.4.4.2 Grupos Experimentais do envolvimento da Via HO-1	40
5.4.5 Avaliação do envolvimento da via NO dependente no efeito antinociceptivo de dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3) na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM	41
5.4.5.1 Drogas utilizadas para avaliação do envolvimento da via NO.....	41
5.4.5.2 Grupos Experimentais do envolvimento da Via NO.....	41
5.5 Teste Rotarod para analisar atividade ansiolítica dos derivados semissintéticos SM-2 e SM-3	42
5.6 Análise Estatística.....	43
6 RESULTADOS	45
6.1 Ensaio de toxicidade aguda e subcrônica	45
6.1.1 Taxa de sobrevivência	45
6.1.2 Alterações comportamentais	46
6.1.3 Alterações do peso corporal	47
6.1.4 Avaliação da hepatotoxicidade	47
6.1.5 Peso relativo dos órgãos dos animais.....	48
6.1.6 Análise histopatológica.....	49
6.2 Estudo da dose-resposta de SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos	50
6.3 Envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva do SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória Induzida por Formalina na ATM de ratos	51
6.4 Envolvimento do Óxido Nítrico Na Atividade Antinociceptiva do SM-2 e SM-3 Na Hipernocicepção Inflamatória Induzida Por Formalina Na ATM De Ratos.....	52
6.5 Efeito do composto semissintético SM-2 e SM-3 no teste do Rotarod	53
7 DISCUSSÃO	55

8 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A.....	75

1 INTRODUÇÃO

O termo Disfunção Temporomandibular (DTM) refere-se a um conjunto de distúrbios funcionais que manifesta um largo quadro de problemas clínicos, que envolvem os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular (ATM) e as estruturas associadas (DE LEEUW *et al.*, 2018; POLUHA *et al.*, 2019). Além das explicações biomecânicas, essas desordens envolvem, adicionalmente, fatores resultantes de uma interação de causas de múltiplos domínios, entre psicológico, ambiental, temporal e genético (SLADE *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2019).

Os estímulos nociceptivos, químicos e mecânicos, para a região orofacial são recebidos pelos neurônios terminais periféricos, nociceptores, cujo corpo celular se encontra no gânglio trigeminal (GT). Essas informações orofaciais nocivas são, então, transmitidas ao subnúcleo espinhal caudal do trato espinal do nervo trigêmeo e à medula espinhal cervical superior (C1-C2), onde são posteriormente transmitidas às regiões somatossensoriais corticais e ao sistema límbico por meio do tálamo, levando à percepção da dor (SHINODA *et al.*, 2019).

Na inflamação da ATM, mediadores inflamatórios como citocinas, óxido nítrico (NO), bradicinina, substância P, trifosfato de adenosina (ATP) são liberados pelos tecidos e exercem papel de comunicação celular, sensibilização neuronal e possível perpetuação da condição álgica (CHAVES *et al.*, 2005; SESSLE, 2011).

Os sinais e sintomas das DTMs podem restringir a função normal e causar dor muscular e articular, ruído das articulações e sensibilidade muscular (SLADE *et al.*, 2016). Essa dor afeta o convívio social, em termos de cuidados de saúde e diminuição da produtividade (LARSON *et al.*, 2019).

Por possuir caráter multifatorial, diagnóstico de difícil classificação, mecanismos que visam a manutenção da dor, por vezes incapacitante, e por procura tardia de tratamento, quando a dor já tem se tornado crônica, lançar mão de abordagens farmacológicas para o alívio sintomático das dores existentes na DTM torna-se crucial para a obtenção de qualidade de vida pelos pacientes, funcionando, assim, como adjuvante ou tratamento principal para a DTM (OKESON, 2008; SESSLE, 2013).

Nesse contexto, os produtos naturais são, muitas vezes, a única forma terapêutica de vários grupos étnicos e de comunidades em diversas partes do mundo (BRAZ-FILHO, 2010;

VAL *et al.*, 2014). Os produtos naturais e suas estruturas moleculares têm uma longa tradição como valiosos pontos de partida para a química medicinal e a descoberta de medicamentos (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Logo, o estudo de produtos naturais, como a *Stemodia maritima* Linn, seus derivados, como estemodina, e substâncias semissintéticas obtidas a partir dessas estruturas podem demonstrar resultados promissores na busca de novas substâncias que auxiliem na terapêutica da dor na ATM.

A *Stemodia maritima* Linn. é uma planta utilizada por populações da Região Nordeste do Brasil para tratar algumas doenças, entre elas as de origem inflamatórias (RODRIGUES *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da *Stemodia maritima* L. e de seu derivado estemodina, obtido de suas folhas, na dor inflamatória da ATM (AZEVEDO, 2019).

Nesse contexto, o Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO) – UFC – Campus do Pici - Fortaleza obtiveram dois semissintéticos, denominados SM-2 e SM-3, derivados da estemodina (SM-1), um diterpeno estemodano isolado da *Stemodia maritima* Linn.

Desse modo, o presente estudo se dispôs a investigar a segurança e a eficácia antinociceptiva desses derivados semissintéticos, SM-2 e SM-3, em modelo experimental de dor inflamatória na ATM de ratos, bem como o mecanismo de ação desses compostos e, assim, podendo contribuir para uma nova abordagem terapêutica no tratamento da dor na ATM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dor Orofacial

A dor fisiológica desempenha um papel importante no mecanismo de defesa do organismo e é essencial para suportar vários processos vitais (SHINODA *et al.*, 2019). Por tempo, a dor foi dividida em dor aguda ou dor crônica, porém a Associação Internacional para o Estudo da Dor, para fins de estudo e tratamento, atualmente, divide-a em três tipos, de acordo com a origem mecanística: nociceptiva, neuropática ou nociplástica (RAJA *et al.*, 2020, LARSON *et al.*, 2019; TROUVIN *et al.*, 2019).

A dor nociceptiva está associada à lesão real ou iminente do tecido, ocorrendo de forma aguda e resolvendo-se com a cicatrização do tecido ou o quando o estímulo nocivo cessa. A dor neuropática é causada por doença ou lesão do sistema nervoso somatossensorial, e pode tornar-se crônica, e a dor nociplástica está associada a alterações no sistema nervoso que fazem com que o corpo registre dor quando não há lesão real ou iminente do tecido, quando há a sensibilização periférica e central (LARSON *et al.*, 2019; TROUVIN *et al.*, 2019).

A dor na região orofacial, uma das áreas mais representadas no córtex cerebral, apresenta diagnóstico desafiador dentre as dores que podem acometer o corpo humano, isso se deve à complexidade do sistema trigeminal, a alta frequência de dor referida na região craniofacial e à alta prevalência de diagnósticos de dor nesta área. Os padrões de referência de dor são complexos, muitas vezes com sintomas que podem se sobrepor, tendo, assim, uma expressão bastante particular (ANANTHAN; BENOLIEL, 2020; RENTON T, 2017). A maioria das doenças craniofaciais dolorosas agudas é facilmente reconhecida e bem tratada, mas outras, especialmente aquelas que são crônicas, como enxaqueca, DTM e neuropatias trigeminais, apresentam desafios de serem tratadas de forma mais eficaz (CHICHORRO *et al.*, 2017).

De fato, a dor orofacial é uma condição comum, podendo tornar-se bastante complexa, com sintomas de dor e incapacidade que afetam várias regiões craniofaciais, envolvendo tecidos moles e duros da cabeça, face e pescoço, como dentes, músculos mastigatórios, língua, articulação temporomandibular (ATM) e nervo trigêmeo (MOYAEDI, 2019; SHIMADA *et al.*, 2019). As dores orofaciais podem incluir dores odontogênicos, em tecidos moles, patologias neurogênicas, dores psicogênicas, câncer, infecções, fenômenos

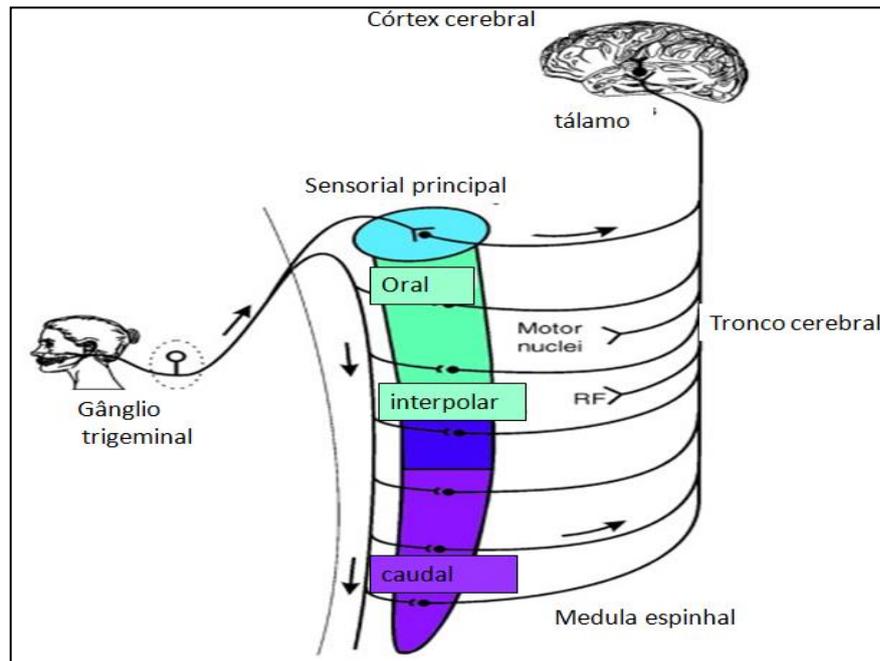
autoimunes, trauma tecidual, problemas na articulação temporomandibular (ATM) e nos tecidos associados (CARRARA; CONTI; BARBOSA, 2010; DE ROSSI, 2013; DE ROSSI, 2014). As características comuns de tais condições são a hiperalgesia mecânica primária ou hipersensibilidade no local da lesão e a hiperalgesia mecânica secundária, assim como pode ocorrer alodinia (SHIBUTA *et al.*, 2012).

Diversos estudos relatam que a dor orofacial possui um alto grau de prevalência na população mundial (GUPTA *et al.*, 2016). De fato, pesquisas demonstram que essa prevalência de dor na região orofacial foi entre 16,1 e 33,2% na população mundial (ANANTHAN; BENOLIEL, 2020). A Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) estima que mais de 10 milhões de pessoas no Brasil são acometidas por esta condição, tornando-a um significativo problema de saúde pública, relacionado a gastos financeiros e ao impacto na qualidade de vida dos pacientes. Anualmente, só nos Estados Unidos, são gastos mais de US \$100 bilhões no tratamento da dor orofacial e de DTM (HEAGGMAN-HENRIKSON *et al.*, 2017).

A dor orofacial é transmitida ao Sistema Nervoso Central (SNC) através da via trigeminal. O nervo trigêmeo, o quinto (V) par de nervos cranianos, cujo corpo celular se situa no gânglio trigeminal, apresenta três ramos, que são o oftálmico, o maxilar e o mandibular, controlando, assim, a musculatura da mastigação e a sensibilidade orofacial. Logo, é um nervo com função mista (motora e sensitiva), com predomínio de função sensitiva, sendo o principal responsável pelas informações nociceptivas da região orofacial. As projeções mandibular, oftálmica e maxilar estão localizadas predominantemente nas regiões dorsal, ventral e medial do corpo, respectivamente (DE ROSSI, 2013; SESSLE, 2005; SHINODA *et al.*, 2019).

Os corpos celulares dos neurônios aferentes trigeminais estão localizados no gânglio trigeminal, que é estruturalmente semelhante ao gânglio da raiz dorsal da medula espinal. No gânglio trigeminal, cada um destes neurônios presentes possui um axônio que se projeta para os tecidos periféricos e outro que se projeta centralmente através do tronco cerebral ipsilateral, onde realiza sinapses com os neurônios de segunda ordem, especialmente no complexo nuclear trigeminal espinal, o qual inclui o núcleo sensorial principal, núcleo mesencefálico, núcleo motor e o núcleo do trato espinhaltrigeminal, sendo este último dividido em três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (DE ROSSI, 2013; LAVIGNE e SESSLE, 2016; SESSLE, 2005; SHINODA *et al.*, 2019) (**FIGURA 1**).

Figura 1. Representação esquemática da via sensitiva principal da região facial.



Fonte: SESSLE, 2005.

O aspecto sensorial do nervo trigêmeo recebe informações dos receptores que codificam estímulos tácteis, nociceptivos, proprioceptivos e de temperatura da face, músculos faciais e mastigatórios e cavidade oral (MOYAEDI, 2019; SESSLE, 2000).

O subnúcleo caudal é a principal via de transmissão do tronco encefálico para as informações nociceptivas do nervo trigêmeo. Estudos anteriores evidenciaram que o subnúcleo caudal é o correspondente ao corno dorsal da medula espinhal na condução da sensibilidade térmica e dolorosa da região orofacial, possuindo duas populações de neurônios nociceptivos, os neurônios de campo dinâmico amplo (WDR) e os neurônios nociceptivos específicos (NE) (SESSLE, 2000; SESSLE, 2009; SESSLE, 2011; LAVIGNE e SESSLE, 2016).

A sensibilização de nociceptores, na região orofacial, faz com que potenciais de ação sejam propagados até o subnúcleo caudal do nervo trigêmeo no tronco encefálico, fazendo com que ocorram modulação e sensibilização dos neurônios de segunda ordem, que podem ascender e transmitir estímulos para serem identificados como dor nas estruturas superiores do córtex somatossensorial do encéfalo no sistema nervoso central. Também, componentes do tronco cerebral, tálamo e outras estruturas como substância cinzenta periaquedutal e núcleo magno da rafe, participam da modulação da informação nociceptiva (SESSLE, 2000; SESSLE, 2005; SHINODA *et al.*, 2019).

Os nociceptores podem desenvolver um aumento prolongado na excitabilidade após a lesão do tecido ou inflamação, tanto que podem desenvolver atividade contínua (ou seja, "espontânea") e tornarem-se mais responsivos à estimulação nociva ou mesmo começar a responder a estímulos que são normalmente inócuos. Este processo, denominado "sensibilização periférica" pode contribuir para o aumento da sensibilidade de um tecido lesado ou inflamado (CHICHORRO *et al.*, 2017; SESSLE, 2011).

A ativação ou sensibilização periférica das terminações nociceptivas envolve muitos tipos diferentes de mediadores químicos, como citocinas, prostaglandinas, glutamato, ácido gama amino butírico [GABA], serotonina [5-HT], noradrenalina, neuropeptídeos, entre outros. Alguns desses mediadores produzem um aumento na excitabilidade das terminações aferentes nociceptivas, sensibilização periférica, e outros podem exercer efeitos inibitórios, influenciando a percepção da dor (CAIRNS; REN, TAMBELI, 2014; CHICHORRO *et al.*, 2017; SESSLE, 2011).

O aumento da compreensão adquirida do processamento fisiológico e patológico da dor orofacial e da nocicepção no sistema trigeminal fornece novas perspectivas para melhores abordagens nos tratamentos atualmente disponíveis, bem como para o desenvolvimento de novas terapias analgésicas, com alvos em receptores periféricos, em neurônios aferentes primários, no subnúcleo caudal do trigêmeo, e no cérebro, assim como modulação do sistema inibitório descendente da dor (CHICHORRO *et al.*, 2017; CAIRNS, 2010).

2.2 Disfunção Temporomandibular (DTM)

A Disfunção Temporomandibular (DTM) têm se apresentado como a dor orofacial de maior frequência na população, estando atrás apenas das dores odontogênicas (DE ROSSI *et al.*, 2014; SHIMADA *et al.*, 2019). É caracterizada por englobar um grupo de condições musculo esqueléticas e neuromusculares, envolvendo músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular (ATM) e tecidos associados, podendo gerar alodínia, dor espontânea e hiperalgesia (DE LEEUW *et al.*, 2013; GREENE *et al.*, 2010; SESSLE, 1999).

Diversos estudos demonstram que aproximadamente um terço da população mundial tem sintomas de DTM, com a prevalência na população geral variando em torno de 20% a 50% em função dos diversos protocolos de diagnósticos (MARKLUND, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2014; HABIB *et al.*, 2015), e com uma incidência de 4% ao ano (SLADE *et al.*, 2013).

Bertoli *et al.* (2018), em um estudo transversal de população de adolescentes brasileiros, encontraram que sintomas de DTM estão presentes em 34,9% da amostra estudada, sendo a dor do tipo miofascial a mais predominante, presente em 10,3%. De Melo Júnior *et al.* (2019) realizaram um estudo transversal com 1.342 adolescentes de 10 a 17 anos, em Recife, no Brasil, para avaliar a prevalência de disfunção temporomandibular e fatores associados. Eles observaram que a prevalência de DTM entre adolescentes foi alta (33,2%), independente da idade ou da classe econômica. Além disso, gênero, cefaleia/enxaqueca, dor crônica e nível de dor crônica tiveram associação estatisticamente significativa com DTM.

Além desses dados epidemiológicos, também se tem demonstrado uma maior prevalência dos sintomas nas mulheres do que nos homens, em uma proporção de 4:1 (ACRI *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2016). Sabe-se também que a sensibilidade dos músculos mastigatórios e da ATM estão presentes em cerca de 15% e 5%, respectivamente, da população. Além disso, é comum ver artralgia e mialgia no mesmo paciente (ANANTHAN; BENOLIEL, 2020).

A etiologia das DTMs é bastante complexa, com origem multifatorial. Nesse contexto, em 2004, o Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos EUA buscou propostas para um estudo de coorte prospectivo para identificar a incidência de dor, disfunção craniofacial e seus fatores de risco, que se seguiu posteriormente financiando um projeto intitulado Dor Orofacial: Avaliação Prospectiva e Avaliação de Risco (OPPERA). Assim, uma variedade de fatores de risco foi medida, variando de genótipos a fenótipos intermediários, de sofrimento psicológico, amplificação de dor, influência ambiental e aspectos clínicos da própria DTM. Logo, verificando alguns fatores de risco anteriormente implicados, refutando outros e lançando uma nova luz sobre a etiologia da DTM (SLADE *et al.*, 2016).

De fato, vários fatores podem estar implicados na etiologia da disfunção temporomandibular (DTM), incluindo idade, gênero, condições psicológicas, como estresse, depressão e ansiedade, assim como alterações do sono, sintomas somáticos, doenças sistêmicas, hábitos parafuncionais, trauma facial, condições genética, condições sócio demográficas (ACRI *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2019; SLADE *et al.*, 2013; SLADE *et al.*, 2016). Além desses, o tempo adiciona outra dimensão, com vários fatores de risco exercendo influências por alguns anos antes que a DTM se manifeste e com alguns flutuando conforme a condição se desenvolve e progride ou regride (SLADE *et al.*, 2016).

Evidências apontam um papel para contribuições genéticas na DTM. Nesse contexto, Pleshet *et al.* (2012), em um estudo de caso-controle, com gêmeos, analisaram se as influências genéticas compartilhadas são responsáveis pela associação entre dor de disfunção temporomandibular (DTM) e enxaqueca, demonstrando herdabilidade de 27%, associada a polimorfismos em genes. Adicionalmente, Smith *et al.* (2019), em um estudo de coorte (OPPERA), relatou evidências genéticas e comportamentais que apoiam um novo mecanismo pelo qual determinados genes e suas expressões moderam a resiliência à dor crônica. Este efeito é específico do sexo masculino e pode justificar as taxas mais baixas de DTM dolorosa em homens.

Sabe-se que as DTMs incluem sinais e sintomas que podem restringir a função normal do sistema estomatognático, resultando em função articular comprometida e redução da abertura da boca e dos movimentos mandibulares (ACRI *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2017). Ademais, percebe-se que durante o exame clínico de pacientes acometidos por DTM, frequentemente ocorre hipersensibilidade à palpação dos músculos mastigatórios e da ATM, além da presença de ruídos articulares (estalidos e crepitações), de sensibilidade dolorosa em músculos cervicais, zumbido, cefaleias, dificuldade para dormir e consequente piora da qualidade de vida, com grande impacto socioeconômico (BLANCO-AGUILERA *et al.*, 2017; OHRBACH; DWORKIN, 2016; SKOG *et al.*, 2019).

Slade *et al.* (2014) em estudo de coorte prospectivo de Dor Orofacial (OPPERA) associou a sensibilização central a hipersensibilidade à dor, correlacionando com as disfunção temporomandibular dolorosa (DTM), ajudando a entender que os sintomas de dor da DTM podem ter consequências que se espalham para além da região orofacial.

Nos últimos anos, a comunidade internacional tem buscado padronizar a classificação para diagnóstico das DTMs. Inicialmente, estabeleceu-se o Critério de Diagnóstico em Pesquisa para DTM (RDC/TMD), assim conseguindo mais uniformidade nos diagnósticos dessa desordem. Ao longo dos anos e acompanhando sua ampla aplicação em pesquisas, o RDC/TMD passou por um extenso processo de validação e atualização. Assim, a última classificação, denominado de DC/RDC, ocorreu pela necessidade de adição de novos instrumentos para avaliar o comportamento da dor, o estado psicológico e o funcionamento psicossocial, sendo de melhor aplicabilidade para uso em ambientes clínicos e de pesquisa (DE MELO JÚNIOR *et al.*, 2019; MOUFTI *et al.*, 2011; OHRBACH, DWORKIN, 2019; SCHIFFMAN *et al.*, 2014).

Após uma classificação diagnóstica, o tratamento das DTMs deve ser inicialmente conservador e multidisciplinar. As possibilidades terapêuticas incluem placas oclusais, laserterapia, TENS, acupuntura, exercícios mandibulares, orientações sobre autocuidado incluindo alimentação, atividade física, prática de meditação, procedimento de fisioterapia, agulhamento seco e agentes farmacológicos (ACRI *et al.*, 2019; LOMAS *et al.*, 2018; GAUER, SEMIDEY, 2015; GREENE *et al.*, 2010).

A terapia farmacológica engloba agentes como relaxantes musculares, corticosteroides, antidepressivos para dor crônica, sendo os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) os mais utilizados. Entretanto, sabe-se que os AINES quando usados por tempo prolongado, podem causar distúrbios no organismo do indivíduo, como alterações gastrointestinais (ACRI *et al.*, 2019; CAIRNS *et al.*, 2010; FINE, 2013; HEIR, 2018).

De fato, as desordens temporomandibulares dolorosas (DTMs) são a principal causa de dor orofacial crônica, afetando as atividades da vida diária de um indivíduo, o funcionamento psicossocial, o trabalho e a qualidade de vida. Nesse sentido, faz-se necessário mais pesquisas que envolvam descobertas relacionadas aos mecanismos moleculares subjacentes, que ainda permanecem obscuros, permitindo, assim, aprimorar estratégias terapêuticas farmacológica, com alvos moleculares e, dessa forma, conseguir proporcionar uma melhor qualidade de vida para essas pessoas (ACRI *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2018).

2.3 Vias de regulação endógena na inflamação da ATM

2.3.1 Heme-oxigenase-1

A via da hemeoxigenase (HO) desempenha um papel importante nos sistemas biológicos, regulando e modulando respostas causadas por inflamação e pelo estresse oxidativo, sendo seus efeitos biológicos amplamente atribuíveis à sua atividade enzimática, que atua na metabolização do grupo heme gerando três subprodutos: o monóxido de carbono (CO), a biliverdina (BVD) e o ferro ferroso (Fe^{2+}) (CHAVES *et al.*, 2018; FACCHINETTI., 2020; PAIXÃO AO *et al.* 2020).

Duas isoenzimas distintas de HO foram identificadas como produtos de genes diferentes: heme oxigenase-1 (HO-1), a isozima induzível, que é constitutivamente expressa em células do fígado e em linfócitos T $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$, ressaltando sua importância para o sistema imunológico e HO-2, a isozima constitutiva, sendo expressa nos tecidos, estando

onipresente em todo o organismo (MAINES *et al.*, 1988; RYTER, 2019; PAIXÃO AO *et al.*, 2020)

Entre as diferentes isoformas de HO, HO-1 é considerada de grande interesse em pesquisa, pois na maioria dos tecidos, HO-1 é indetectável em condições basais, mas altamente induzível em várias condições fisiopatológicas de estresse, inflamação, fatores como luz ultravioleta, hipóxia, metais pesados, óxido nítrico, citocinas inflamatórias, etanol, prostaglandinas e choque térmico (PAIXÃO AO *et al.*, 2020; RYTER, 2019; WAZA *et al.*, 2018).

De fato, a isoforma Hemoxigenase-1 (HO-1) vem sendo bastante pesquisada devido às suas potentes propriedades protetoras, desempenhando ações anti-inflamatórias, antioxidantes, antiapoptóticas e antiproliferativas, e exercendo funções citoprotetoras em diversos tipos celulares, bem como em diferentes tipos de lesões em modelo animal e em humanos (PAIXÃO AO *et al.*, 2020; RYTER, 2019; WAZA *et al.*, 2018).

Pesquisas realizadas anteriormente relatam que diferentes indutores de HO-1 ativam diversas vias de sinalização dependentes da fosforilação de proteínas que, em última análise, regulam a expressão de determinados genes, ativando uma ampla variedade de fatores de transcrição (WAZA *et al.*, 2018).

O real mecanismo subjacente responsável pelas propriedades antiinflamatórias de HO-1 somente foi parcialmente elucidado. Sabe-se que o ferro derivado de HO pode promover a síntese de ferritina, uma molécula citoprotetora, que sequestra o ferro ativo redox intracelular em uma forma inerte (VILE *et al.*, 1993; RYTER, 2019). Entretanto, em altas concentrações intracelulares, pode causar dano à célula e ao DNA (WAS *et al.*, 2010).

Além do ferro, outro subproduto do catabolismo da HO, a BVD, possui função citoprotetora, sendo reduzida à bilirrubina por uma enzima citosólica, a biliverdina redutase. Essa bilirrubina reage diretamente com espécies reativas de oxigênio, neutralizando sua propagação no ambiente intracelular, sendo, em diversos estudos, comprovado que pequenas concentrações de biliverdina agem como um potente agente antioxidante (PAIXÃO AO *et al.*, 2020; RYTER, 2019).

Estudos demonstram que o CO, outro subproduto gerado da degradação do grupo heme, atua como um agente antiinflamatório eficiente em vários modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*, participando do aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias (OTTERBEIN *et al.*, 2000) e interferindo com a diminuição da adesão de leucócitos ao endotélio vascular, dentre outras ações (HAYASHI *et al.*, 1999; WAZA *et al.* 2018). Apesar da toxicidade bem

elevada de CO em alta concentração, duas décadas de pesquisa revelaram que baixas de CO podem conduzir como vias de transdução de sinal intracelular (RYTER, 2006; RYTER, 2019).

Sabe-se que pesquisas têm conseguido comprovar a ação de sinalização do CO, juntamente a ação da biliverdina/bilirrubina e sequestro de ferro pela ferritina, que podem contribuir na melhora da inflamação (OTTERBEIN *et al.*, 2000; WAZA *et al.*, 2018).

Ademais, estudos sugerem um efeito anti-inflamatório da via da HO-1/BVD/CO, ao se demonstrar que a inibição da HO-1 pelo Zinco protoporfirina-IX (ZnPP-IX), um inibidor específico de HO-1, aumenta a expressão de moléculas de adesão, bem como a liberação de mediadores pró-inflamatórios (HUALIN *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que HO-1 é expresso no tecido sinovial e em monócitos do sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide (BENALLAOUA *et al.*, 2007; KOBAYASHI *et al.*, 2006). De fato, Benallaoua *et al.* (2007) demonstraram em um modelo de artrite não autoimune em camundongos, uma resposta antiinflamatória protetora da regulação positiva de HO-1, sugerindo que HO-1 induzido exogenamente pode ter potencial como terapia na fase aguda da artrite inflamatória em humanos.

Em outro estudo e corroborando com esses dados, Chaves *et al.*, (2018) pesquisaram o papel da HO e seus metabólitos, monóxido de carbono (CO) e biliverdina (BVD), na artrite da articulação temporomandibular (ATM) induzida por zymosan em ratos, conseguindo demonstrar que a indução de HO-1 por produtos finais da via HO-1, suprimiu o desenvolvimento de inflamação e hipernocicepção na artrite da ATM, através de análises histopatológicas e bioquímicas. A análise imuno-histoquímica deste estudo mostrou aumento da expressão de HO-1 em sinoviócitos, condrócitos e neutrófilos da ATM com artrite induzida por zymozan, sugerindo que essas células provavelmente estão envolvidas na síntese de citocinas e podem ser moduladas pelo HO-1/Via BVD/CO. Ademais, foi o primeiro estudo a basear a noção de que a via do canal de K⁺ sensível a HO / CO / cGMP / ATP pode modular a hipernocicepção inflamatória durante a artrite da ATM induzida por zymosan.

O conhecimento dessa via e a identificação de indutores HO-1 não citotóxico pode representar uma nova abordagem para combater várias respostas oxidativas e inflamatórias (WAZA *et al.*, 2018). Logo, podem-se sugerir a partir dessas pesquisas novos alvos farmacológicos da condição dolorosa inflamatória da ATM.

2.3.2 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um gás produzido nos sistemas biológicos, através da reação bioquímica entre L-arginina, fonte do nitrogênio de seu grupo guanidino terminal, e o oxigênio molecular (O₂), sendo catalisado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). O NO modula um amplo espectro de condições fisiológicas e fisiopatológicas (MONCADA *et al.*, 1991; SPILLER, *et al.*, 2019).

Três isoformas distintas da NOS foram identificadas, que incluem NOS neuronal ou do tipo I (NOS_n), inicialmente isolada do tecido neural, e NOS endotelial ou do tipo III (NOS_e), isolada do endotélio, sendo essas duas isoformas consideradas constitutivas e dependente de um aumento na concentração de cálcio no tecido para atividade. Além dessas duas formas constitutivas, foi identificada uma isoforma induzida (NOS_i) ou do tipo II, independente de cálcio, isolada inicialmente de macrófagos e sendo expressa sob certas condições, como inflamação, estresse oxidativo e processos patológicos (PALMER *et al.*, 1987; BREDET *et al.*, 1991; FAN *et al.*, 2012; SESSA *et al.*, 1992 ; XIE *et al.*, 1994).

Ademais, sabe-se o NO produzido pode ativar a via da enzima guanilato ciclase solúvel, que leva a produção do segundo mensageiro GMPc, cuja elevação dos níveis intracelulares, no neurônio nociceptivo, inibe a hipersensibilidade (BEZERRA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 1999; SHINODA *et al.*, 2019). De fato, estudos demonstraram que a ativação dessa via guanilato ciclase se dá pelo aumento da condutância de íons K⁺, pela abertura de canais de potássio, ATP dependente (K⁺ ATP). O cGMP ativa a proteína kinase G dependente do cGMP, que ativa e modula vários tipos de moléculas alvo por fosforilação (FAN *et al.*, 2012; SACHS *et al.*, 2004; SHINODA, *et al.*, 2019).

O papel do NO no aparecimento e manutenção da dor durante as doenças inflamatórias tem sido amplamente investigado (CINELLI *et al.*, 2020; SPILLER, *et al.*, 2019). Na dor inflamatória articular, o NO é derivado de células residentes, articulares sinoviócitos e condrócitos, assim como por osteoblastos e osteoclastos, ou de novas células emigradas, como neutrófilos e monócitos (SPILLER *et al.*, 2019).

Sabe-se que durante um processo inflamatório, os neutrófilos migrantes ativados participam da cascata de eventos que levam à hiperalgesia mecânica ao produzir mediadores hipernociceptivos, como a prostaglandina E₂, citocinas e NO, participando, assim, ativamente do desenvolvimento da dor (TRIPATHI, 2007; SPILLER, *et al.*, 2019).

Pesquisas anteriores demonstraram que na artrite induzida por zymosan, o tratamento profilático com L-NAME ou aminoguanidina inibiram a nocicepção e o influxo de leucócitos (ROCHA *et al.*, 2003; SPILLER, *et al.*, 2019).

Em outro estudo realizado por Chaves *et al.* (2011) foi demonstrado que a indução de artrite na articulação temporomandibular de ratos foi associada aos altos níveis de incapacidade relacionada à dor, infiltração de neutrófilos, aumento da expressão de iNOS e hipernocicepção mecânica, que foram inibidos por L-NAME (CHAVES *et al.*, 2011). Outros estudos com indução de artrite na articulação temporomandibular por formalina tem demonstrado que o inibidor da NOS reduz significativamente a hiperalgesia em dor orofacial (JUNG *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012).

2.4 Modelo de dor inflamatória na ATM induzida por formalina

Os modelos animais permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos nas condições dolorosas que afetam a articulação temporomandibular (ATM). Entre esses modelos podemos citar o teste de formalina orofacial em roedores, que é amplamente utilizado para se avaliar a ação de fármacos analgésicos ou de produto naturais com atividade antinociceptiva, sendo considerado um modelo pré-clínico bem estabelecido, válido e confiável, para investigar a eficácia de fármacos na região facial através da ativação de fibras do nervo trigêmeo (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK *et al.*, 1995; DUBUISSON; DENNIS, 1977; CLAVELOU *et al.*, 1995; LUCCARINI *et al.*, 2006).

A formalina é um agente químico que estimula as fibras nociceptivas de forma direta e indireta, evocando a resposta nociceptiva. Logo, o teste de Formalina baseia-se na indução de um dano tecidual, através desse estímulo químico, que mimetiza a dor aguda após lesão tecidual em humanos. (DALLEL *et al.*, 1995; LUCCARINI *et al.*, 2006, RABOISSON; DALLEL, 2004).

Esse modelo de teste é constituído por duas fases, sendo a primeira fase de curta duração (fase neurogênica), induzida por uma ativação direta das fibras nociceptivas C e a segunda fase, uma fase mais prolongada, tônica, (fase inflamatória), mediada pela estimulação contínua de nociceptores por mediadores inflamatórios liberados do tecido lesado, que levam à sensibilização dependente da atividade dos neurônios do sistema nervoso central dentro do corno dorsal (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Estudos sugeriram uma modificação no teste de formalina para avaliar os mecanismos dolorosos provenientes da região orofacial de rato (CLAVELOU *et al.*, 1989; ROVERONI, 2001). Os pesquisadores concluíram que a injeção de formalina, diferentemente da solução

salina, prova exacerbação no ato de coçar a região orofacial, comportamento que sinaliza a resposta nociceptiva (CLAVELOU *et al.*, 1995; ROVERONI, 2001).

2.5 Gênero *Stemodia*

O gênero *Stemodia* é inserido na família Plantaginaceae (tradicionalmente o gênero *Stemodia* era classificado na família Scrophulariaceae), representado por cerca de 60 espécies, concentradas especialmente na América e na Austrália. (CHAMY *et al.*, 1991; SCATIGNA 2020; SILVA, 2009; SOUZA, 2015). Representada por ervas e arbustos, é um gênero de plantas de florescência, perenes com folhas simples, dentadas, sésseis, com filotaxia opostas cruzadas e presença de tricomas, possui Inflorescência em cachos, com flores em tom lilás (CHAMY *et al.*, 1991; HASSLER, 2017).

Variadas culturas em todo o mundo fazem uso das espécies do gênero *Stemodia* para tratar diversas doenças, como dor de estômago, edema, retenção de líquido e o tratamento de doenças venéreas. De fato, dados da literatura sugerem ação antiviral, citotóxica e larvicida da *Stemodia*, além de relatos do uso de *Stemodia durantifolia* para o tratamento de infertilidade. Nesse contexto, o estudo químico das espécies de *Stemodia* tem resultado em contribuições relevantes na elucidação estrutural e na síntese de compostos com atividades biológicas relevantes (ALLEN *et al.*, 2006; CHAMY *et al.*, 1991; RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009).

O estudo das espécies do gênero identificou algumas classes de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos esteroidais, curcubitacinas, esteroides glicosilados e diterpenos (RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2008; SILVA; SILVEIRA; PESSOA, 2010).

2.5.1 *Stemodia marítima* Linn.

Stemodia marítima Linn. (**Figura 2**) é um arbusto perene, pertencente ao gênero *Stemodia* e à família Plantaginaceae. Essa espécie, conhecida como “mastruz-bravo” ou “melosa, cresce na Região Nordeste do Brasil, próximo à costa marítima, em áreas salinizadas, tendo sido identificada em outras áreas da América do Sul (RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2006).

Figura 2. Foto de *Stemodia maritima* Linn.



Fonte: https://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/15015148887/in/photostream/

Foto de Alex Popovkin, Bahia, Brasil.

O estudo químico de *Stemodia maritima* Linn. proporcionou o isolamento e conhecimento de compostos como Estemodina, estemodinosídeo, jaceidina, estemodinol, crenatosídeo, isocrenatosídeo, isoverbascosídeo e verbascosídeo (ALJANCIC *et al.*, 2010; ALLISON *et al.*, 2017).

A estemodina é o diterpeno estemodano mais relatado de *S. maritima*. Possui vários análogos hidroxilados obtidos por biotransformações microbianas, e alguns têm apresentado atividade antiviral (HANSON *et al.*, 1994; BUCHANAN; REESE, 2001; CHEN *et al.*, 2005). O Estemodinosídeo, outro composto da *Stemodia maritima* Linn., apresenta atividade antibacteriana contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* e a Jaceidina, uma flavanona descrita em *Stemodi amaritima*, demonstra atividade antioxidante, antibacteriana (ALJANCIC *et al.*, 2010; ALLISON *et al.*, 2017).

O crenatosídeo, obtido a partir das raízes de *S. maritima*, apresentou atividade antioxidante comparável à da vitamina C (SILVA *et al.*, 2014). Além disso, Crenatosídeo e isocrenatosídeo apresentam atividade antiviral, inibindo seletivamente a neuraminidase, que são cruciais para a replicação e infecciosidade do vírus (SILVA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

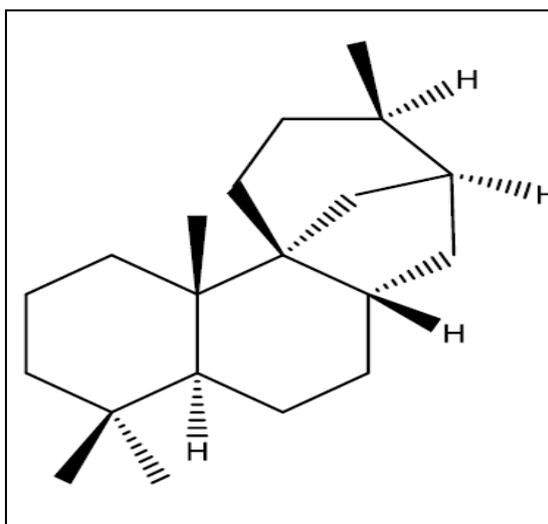
Recentemente, Teixeira *et al.* (2017) demonstrou que as folhas da *Stemodia marítima* Linn possuem efeitos positivos no combate a perda óssea causada pela periodontite. Além

desse estudo, Azevedo (2019) comprovou efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos da *Stemodia marítima* Linn e do composto estemodina no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida formalina. Nesse contexto, ressalta-se que os produtos naturais são estruturalmente diversos, com presença de metabólitos secundários que servem como fonte de estudo no desenvolvimento de novos fármacos.

2.6 Metabólitos secundários e derivados semissintéticos

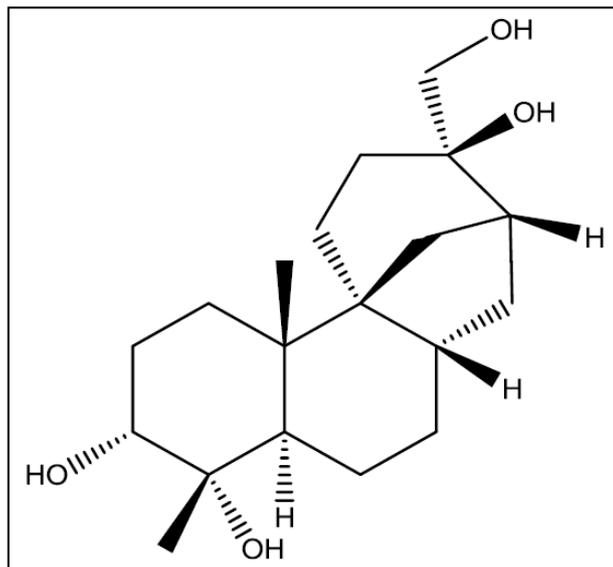
A estemodina é um diterpeno, com esqueleto tetracíclico raro, conhecidos como estemodano (Figura 3), que caracterizam quimicamente as plantas do gênero *Stemodia*.

Figura 3. Estruturas dos esqueletos estemodano



Fonte: SILVA, 2017.

Estes metabólitos secundários, os estemodanos, apresentam semelhança com a aphidicolina (**Figura 4**), um relevante agente citotóxico e antiviral isolado de culturas do fungo *Cephalosporium aphidicola*. Devido à semelhança e por relatos de apresentarem propriedades antiviral e citotóxica, esses metabólitos têm sido alvos de inúmeras biotransformações, resultando em diterpenoides rearranjados biologicamente ativos (CHAMY *et al.*, 1991; RUSSELL *et al.*, 2011).

Figura 4. Estrutura de aphidicolina

Fonte: SILVA, 2017.

De fato, atualmente, com técnicas de separação e de identificação mais modernas, estes constituintes químicos são isolados, descritos, podendo ser muitas vezes modificados estruturalmente para alterar ou potencializar suas atividades biológicas, conseguindo, assim, ter uma maior atividade desejada em menores doses que os compostos naturais inalterados, além de não serem muitas vezes rapidamente metabolizados. Além disso, podendo interferir no custo de produção, eficiência de tempo, fácil controle de qualidade, regulamentação rigorosa. Esse aprimoramento de moléculas inicialmente naturais tornando-se posteriores análogos é uma notável evolução na produção e inovação biotecnológica de fármacos (BRAZ-FILHO, 2010; NEWMAN, 2008; CRAGG; NEWMAN, 2013; DAVID *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a estemodina (SM-1) sofreu modificações químicas estruturais em sua molécula para a obtenção dos dois derivados semissintéticos, SM-2 e SM-3, que foram alvo deste estudo.

3 JUSTIFICATIVA

Embora existam diversas modalidades de tratamento para as DTMs, o seu manejo clínico é complexo, devendo-se escolher em primeiro plano um método conservador, reversível e não invasivo. As terapias empregadas atualmente não são curativas, limitando-se a aliviar os sintomas da doença (CAIRNS *et al.*, 2010; SASSI *et al.*, 2018). As intervenções terapêuticas farmacológicas atuais utilizadas no tratamento de dores resultam, muitas vezes, em efeitos indesejáveis que limitam a sua utilidade clínica (ADEOLUWA, 2014).

Nesse contexto, a crescente busca por agentes terapêuticos derivados de plantas justifica-se pela quantidade de doenças ainda sem tratamento efetivo e pelo reconhecimento científico de fitofármacos e derivados semissintéticos como importantes alternativas terapêuticas para o tratamento de distúrbios temporomandibulares. O estudo de compostos obtidos e derivados de plantas medicinais, como *Stemodia maritima* Linn, pode contribuir para desenvolvimento de alternativas farmacológicas capazes de ajudar no tratamento da dor inflamatória na ATM. De fato, esses estudos podem auxiliar na obtenção de dados para uma maior segurança farmacológica e, assim, menos efeitos adversos (RAMOS; DUARTE; JIMENEZ, 2015).

Existem diversas evidências na literatura das propriedades terapêuticas de extratos provenientes da planta *S. maritima* usadas para vários propósitos medicinais, como ação antiviral, citotóxica, larvívica e antitumoral (RODRIGUES *et al.*, 2010). Recentemente, Azevedo (2019) realizou estudos utilizando o modelo de hipernociceção inflamatória induzida na ATM, comprovando a eficácia antiinflamatória e antinociceptiva da *S. marítima* e de seu composto isolado, estemodina, o que fez despertar o interesse na investigação das atividades biológicas e mecanismos de ação dos compostos semissintéticos, SM-2 e SM-3, obtidos a partir da estemodina (extraídos de folhas da *Stemodiamaritima* Linn.) no desenvolvimento de potenciais fármacos como novas alternativas terapêuticas de doenças inflamatórias na ATM.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a segurança e a eficácia antinociceptiva de dois compostos semissintéticos, SM-2 e SM-3, no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida na articulação temporomandibular de ratos.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade *in vivo* de dois derivados semissintéticos SM-2 e SM-3 em camundongos;
- Investigar os efeitos antinociceptivo de SM-2 e SM-3 no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos Wistar;
- Investigar o mecanismo de ação SM-2 e SM-3, avaliando o envolvimento das vias HO-1 e NO no modelo hipernocicepção inflamatória induzida pela formalina na ATM de ratos;
- Avaliar a influência de SM-2 e SM-3 na motricidade e coordenação motora dos animais através do teste *Rotarod*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Modelo Animal e princípios bioéticos

Neste estudo foram utilizados 30 camundongos machos (*Mus musculus*) (25-30g), albinos, para determinação da toxicidade aguda e subcrônicos dos compostos semissintéticos (SM-2 e SM-3). Além desses animais, foram utilizados para avaliação da eficácia antinociceptiva e ação na motricidade, 95 ratos machos (*Rattus norvegicus*), albinos, variação Wistar (180-220 g), em grupos com n=5, aleatoriamente distribuídos.

Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do (UFC) e do biotério local da Faculdade de Medicina de Sobral, UFC-Campus Sobral e ficaram alojados em gaiolas de plástico padronizadas em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) obedecendo aos ciclos de claro e escuro (de 12 em 12 horas) no Biotério Setorial da UFC - Campus Sobral até o início dos experimentos, recebendo água e alimentação *ad libitum*.

Quanto aos aspectos éticos, o protocolo experimental foi elaborado de acordo com a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA” do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) sob aprovação de nº 11/18. Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento animal.

5.2 Compostos semissintéticos SM-2 e SM-3

Os dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3) foram elaborados pelo Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO)- UFC – *Campus* do Pici - Fortaleza. O diterpeno estemodina (SM-1), obtidos da folha da *Stemodia maritima* Linn., sofreu modificações químicas estruturais em sua molécula para a obtenção dos derivados semissintéticos SM-2 e SM-3. Os detalhes estruturais desses dois derivados semissintéticos ainda não podem ser apresentados uma vez que serão objeto de patente.

5.3 Estudo da toxicidade *in vivo* do SM-2 e SM-3

Na perspectiva de avaliar se os compostos semissintéticos SM-2 e SM-3 apresentam alguma toxicidade local ou sistêmica, foi realizado inicialmente um ensaio de segurança baseado no protocolo 420 (2001) da OCDE (*Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico*). Neste estudo foram feitos ensaios com doses únicas (toxicidade aguda) e repetidas (toxicidade subcrônica).

Foram usados 30 camundongos albinos *Mus musculus*, machos, divididos em três grupos de dez animais. Para cada semissintético existiu um grupo de machos (n=10), assim como para o grupo controle (n=10). A substância controle utilizada foi solução salina 0,9%. Foram testados o composto SM-2 na dose de 10µg e o composto SM-3 na dose de 10µg.

O estudo de dose única consistiu na administração da substância testada via oral (gavagem, *v.o*) em uma única dose e observado por um período não superior a 24 horas. Após 24 horas o estudo de dose única foi finalizado e os animais passaram a fazer parte do estudo de doses repetidas, onde diariamente os animais receberam a mesma dose do composto, baseando-se no peso do animal, durante 14 dias.

No estudo de toxicidade aguda (dose única, 24 horas), após a administração da dose do composto, os animais foram observados por examinadores calibrados nos intervalos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas, visando observar se houve alterações de comportamento que pudessem indicar morbidade ou mortalidade, a saber: piloereção, agressividade, sonolência, contorção abdominal, lambidas, cambalhotas, agitação, pulsão sexual, perda de peso e morte (VAL *et al.* 2014).

Após as 24 horas iniciais (fim do experimento de toxicidade aguda, com dose única), iniciou-se o experimento de toxicidade subcrônica (doses repetidas). Essa fase consistiu na administração da dose dos derivados de acordo com o peso do animal, durante 14 dias consecutivos, no mesmo horário, e a observação por 15 minutos seguidos dos mesmos parâmetros comportamentais de morbimortalidade utilizados no estudo de toxicidade aguda, subsequentemente à administração do derivado ou substância controle durante os 15 dias. No 15º dia, os animais foram anestesiados (*i.p.*), e amostras de sangue periférico foram coletadas a partir do plexo retro-orbitário para as dosagens de aspartato aminotransferase (AST) / alanina aminotransferase (ALT), com objetivo de avaliar as funções hepáticas, respectivamente. Os parâmetros bioquímicos foram determinados por testes enzimáticos e

colorimétricos de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Em seguida, os camundongos foram submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical, seguido da retirada e pesagem dos órgãos (fígado, rim e estômago). Após processamento histopatológico, foi realizada análise microscópica por patologista dos órgãos removidos, em microscópio óptico acoplado ao sistema de captura de imagens digitais. Os aumentos utilizados foram: 100x, para aspectos morfológicos gerais e 400x, para análise detalhada dos eventos histológicos, tanto celulares quanto na matriz extracelular (MEC), com análise cega de grupos experimentais (fármacos-teste), seguindo a norma ISO 10993-11. Os fígado, o estômago e o rim corados com hematoxilina e eosina (H&E) foram avaliados quanto ao edema, dano hemorrágico, congestão vascular e células inflamatória, com escores de (0–3) para cada um desses parâmetros. Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados aos de animais controle que receberam apenas solução salina estéril 0,9 % (v.o.), nas mesmas condições que os animais tratados.

5.4 Delineamento Experimental

5.4.1 Avaliação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos

Os animais foram pré-tratados por via oral (v.o) com SM-2 (1 ou 10 µg/kg) ou SM-3 (1 ou 10 µg/kg). Uma hora após o pré-tratamento, os animais receberam uma injeção intra-articular (i.art.) de Formalina 1,5 % (50 µL), sendo em seguida submetidos à análise comportamental para avaliar a resposta nociceptiva. O grupo Salina (grupo controle) recebeu solução salina 0,9% via oral (v.o) seguida de solução salina 0,9% (50 µL, i.art.), o grupo Formalina recebeu solução salina 0,9% via oral (v.o) seguida de formalina 1,5% (50 µL, i.art.), e o Controle Positivo recebeu indometacina (5 mg/kg) subcutânea (s.c.) seguido de formalina 1,5% (50 µL, i.art.).

Previamente à injeção intra-articular, os animais foram brevemente anestesiados com isoflurano por inalação (ROVERONI *et al.*, 2001). Cada grupo foi composto por cinco animais (n=5), ratos machos, *Rattus norvegicus*, albinos, Wistar, pesando entre 180 a 220g.

5.4.1.1 Grupos experimentais da avaliação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do SM-2 e SM-3:

Grupo Salina: O grupo recebeu (v.o) o veículo (salina 0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de solução salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Formalina: O grupo recebeu (v.o) solução salina 0,9 % e, 1 h após, injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Indomentacina (Indo): O grupo recebeu pela via (s.c) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em solução salina estéril, seguido 30 min após da injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-2 (1µg/kg): O grupo recebeu (v.o) SM-2 na dose 1µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 % (50µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-2 (10µg/kg): O grupo recebeu (v.o) SM-2 na dose 10µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 % (50µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-3 (1µg/kg): O grupo recebeu (v.o) SM-3 na dose 1µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 % (50µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-3 (10µg/kg): O grupo recebeu (v.o) SM-3 na dose 10µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 % (50µL) na ATM esquerda; (n=5)

Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação.

5.4.2 Injeções intra-articulares

Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam uma injeção do agente inflamatório formalina 1,5% (Formaldeído, Sigma Aldrich; SIGMA – H9523) no volume de 50µL (ROVERONI *et al.*, 2001). Para administração da salina ou formalina na ATM, uma agulha calibre 30G, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 µl) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático

da ATM esquerda, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo.

5.4.3 Testes comportamentais para a avaliação da resposta nociceptiva induzida pela Formalina

As análises comportamentais foram realizadas durante a fase clara, entre 9h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida entre $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ROSLAND, 1991). Cada animal foi utilizado em um único experimento. Durante o teste, os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de 7 dias, para que os ratos se acostumassem ao manuseio e a presença de humanos no teste comportamental e, assim, minimizassem o estresse durante as sequências experimentais. Para a realização das análises comportamentais, uma caixa de observação de madeira medindo 30x30x30 cm, com sua parte superior aberta, 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada (**Figura 5**). Previamente a administração intra-articular cada animal foi colocado e mantido na caixa por 10 minutos, para habituar-se ao ambiente de experimentação no dia, minimizando o estresse e interferências na avaliação comportamental (ABBOTT *et al.*, 1986, ROSLAND, 1991).

Imediatamente após a injeção intra-articular o animal já consciente, foi recolocado na caixa de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 min., divididos em 15 blocos de 3 min. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (OLIVEIRA-FUSARO *et al.*, 2012; ROVERONI *et al.* 2001).

Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 segundo de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizada (ROVERONI, *et al.* 2001).

Figura 5. Caixa espelhada de observação do comportamento



Fonte: Luiz Marques da Rocha Neto, 2019

5.4.4 Avaliação do envolvimento da via HO-1 no efeito antinociceptivo de dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3) na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM

Para determinar se o efeito antinociceptivo de SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM depende da via HO-1 foram utilizadas drogas que atuam na via previamente à administração por via oral (v.o) dos dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3).

Os animais foram pré-tratados (30 min) com zinco protoporfirina IX, ZnPP-IX, (3 mg/kg, sc), seguido pela administração via oral (v.o) do SM-2 na dose de 10 µg/kg ou SM-3 na dose de 10 µg/kg. E após uma hora, os grupos de animais tratados receberam uma injeção intra-articular de formalina 1,5% (50 µL). As respostas comportamentais de nocicepção foram avaliadas por um período de observação de 45 minutos.

5.4.4.1 Drogas utilizadas para avaliação do envolvimento da via HO-1

- Indometacina (5 mg/kg, i.p.), inibidor de COX, diluído em salina estéril (0,9%), utilizado como controle positivo;

- ZnPP IX (3 mg/kg, s.c.), inibidor seletivo da enzima HO-1, diluído em solução tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃) 50 mM e salina estéril (0,9 %);

5.4.4.2 Grupos Experimentais do envolvimento da Via HO-1

Grupo Salina (controle do Grupo ZnPP IX): O grupo recebeu (s.c) salina 0,9%, 30 minutos após receberam via oral (v.o) o veículo (salina 0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de solução salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Formalina: O grupo recebeu (s.c) salina 0,9%, 30 minutos após receberam via oral (v.o) o veículo (salina 0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Indomentacina (Indo): O grupo recebeu pela via (s.c) indometacina (5mg/kg) dissolvida em solução salina estéril, seguido 30 min após da injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo ZnPP-IX: O grupo recebeu (s.c) ZnPP-IX (3 mg/kg), 30 minutos após receberam via oral(v.o) o veículo (salina 0,9%) e, após 1h, receberam injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-2: O grupo recebeu (s.c) salina 0,9%, 30 minutos após receberam via oral (v.o) SM-2 na dose 10µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 % (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-2 tratado com ZnPP-IX: O grupo recebeu (s.c) ZnPP-IX (3 mg/kg), 30 minutos após receberam via oral (v.o) SM-2 10µg/kg e, após 1h, receberam a injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-3: O grupo recebeu (s.c) salina 0,9%, 30 minutos após receberam (v.o) SM-3 na dose 10µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 % (50µL) na ATM esquerda

Grupo SM-3 tratado com ZnPP-IX: O grupo recebeu (s.c) ZnPP-IX (3 mg/kg), 30 minutos após receberam (v.o) SM-3 10 µg/kg, após 1h, receberam a injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

5.4.5 Avaliação do envolvimento da via NO dependente no efeito antinociceptivo de dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3) na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM

Para determinar se o efeito antinociceptivo de SM-2 e SM-3 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM depende da NO foram utilizadas drogas que atuam na via previamente à administração por via oral (v.o) dos dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3).

Os ratos foram pré-tratados (30 min) com aminoguanidina (30 mg/kg; ip), um inibidor seletivo da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), seguido pela administração (v.o) do SM-2 na dose de 10 µg/kg ou SM-3 na dose de 10 µg / kg e após uma hora, os grupos de animais tratados receberam uma injeção intra-articular de formalina 1,5% (50 µL). As respostas comportamentais de nocicepção foram avaliadas por um período de observação de 45 minutos.

5.4.5.1 Drogas utilizadas para avaliação do envolvimento da via NO

- Indometacina (5 mg/kg, i.p.), inibidor de COX, diluído em salina estéril (0,9 %), utilizado como controle positivo;
- Aminoguanidina (30 mg/kg; i.p.), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), diluído em solução salina estéril (0,9 %);

5.4.5.2 Grupos Experimentais do envolvimento da Via NO

Grupo Salina: O grupo recebeu (i.p) salina 0,9%, 30 min após receberam via oral (v.o) o veículo (salina 0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de solução salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda;(n=5)

Grupo Formalina: O grupo recebeu (i.p) salina 0,9%, 30 min após receberam (v.o) o veículo (salina 0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Indomentacina (Indo): O grupo recebeu pela via (i.p) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em solução salina estéril, seguido 1h após da injeção (i.art.) de formalina 1,5% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Aminoguanidina: O grupo recebeu (i.p) Aminoguanidina (30 mg/kg), após 30 min receberam o veículo salina 0,9%(v.o) e, 1 h após, injeção (i.art.) de solução salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo SM-2: O grupo recebeu (i.p) salina 0,9%, 30 minutos após receberam via oral (v.o) SM-2 na dose 10µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 % (50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Aminoguanidina + SM-2: O grupo recebeu (i.p) Aminoguanidina (30 mg/kg), após 30 min receberam (v.o) SM-2 na dose 10µg/kg e, 1 h após, injeção (i.art.) de solução salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda;(n=5)

Grupo SM-3: O grupo recebeu (i.p) salina 0,9%, 30 minutos após receberam (v.o) SM-3 na dose 10µg/kg e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina 1,5 %(50 µL) na ATM esquerda; (n=5)

Grupo Aminoguanidina + SM-3: O grupo recebeu (i.p) Aminoguanidina (30 mg/kg), após 30 min receberam(v.o)SM-3 10µg/kg e, 1 h após, injeção (i.art.) de solução salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda. (n=5)

5.5 Teste *Rotarod* para analisar atividade ansiolítica dos derivados semissintéticos SM-2 e SM-3

O teste do *Rotarod* é um dos mais antigos empregados na área de estudo dos efeitos motores induzidos por uso de drogas em estudos pré-clínicos, mensurando o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas

em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm (**Figura 6**). A avaliação ocorreu por um período de 5 minutos, após 1 hora da administração por via oral de SM-2 (10µg/kg) ou SM-3 (10µg/kg) ou veículo (salina 0,9%), sendo registrados o tempo de latência (segundos) e o número de quedas (PIEL, 2014; DUNHAM; MIYA, 1957).

Figura 6. Equipamento para o Teste de *Rotarod*



Fonte: PIEL, 2014.

5.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentaram-se com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de outliers foram retirados (quando ocorreram), por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk). Os

dados paramétricos foram analisados através do teste de ANOVA. O pós-teste (post-hoc) para a ANOVA foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Em caso de homogeneidade de variâncias ($p\text{-valor} \geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ($p\text{-valor} < 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell. Foi considerado o nível crítico de significância de 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

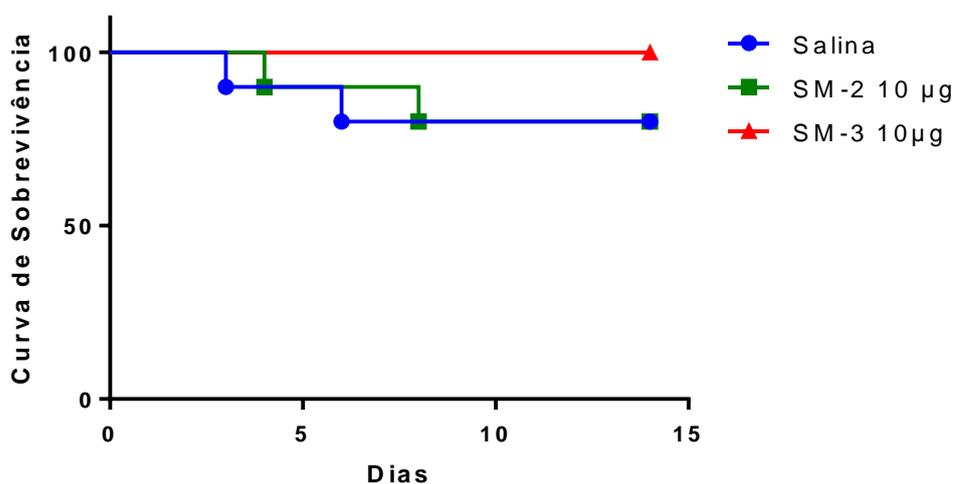
6.1 Ensaio de toxicidade aguda e subcrônica

Para investigar a segurança do SM-2 e SM-3, foi realizado um ensaio de toxicidade, baseando-se no protocolo 420 da OCDE (OCDE, 2001), com algumas adaptações. Os animais, camundongos machos, foram tratados (v.o) diariamente por 14 dias com SM-2 (10 μ g/kg) ou SM-3 (10 μ g/kg). O grupo controle recebeu (v.o) apenas o veículo (solução salina 0,9%).

6.1.1 Taxa de sobrevivida

Não foi observada mortalidade nos animais do grupo SM-3 durante os 14 dias de tratamento, apresentando taxa de sobrevivida de 100%. O grupo Salina apresentou taxa de sobrevivida de 80%, com duas mortes (dias 3 e 6), e o grupo SM-2 apresentou taxa de sobrevivida de 80%, com duas mortes (dias 4 e 8) (FIGURA 7; TABELA 1).

Figura 7. Taxa de sobrevivida dos animais no ensaio de segurança de SM-2 e SM-3.



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da Pesquisa (2020). **Legenda:** Cada grupo é representado por um símbolo colorido, com uma linha contínua. Cada decréscimo na curva representa a aproximação do percentual 0 (eixo y) e a morte de um animal naquele grupo no dia em questão (eixo x). Esta queda na curva representa o decréscimo de percentual de sobrevivida.

Tabela 1: Número total de mortes no ensaio de segurança de SM-2 e SM-3.

Grupos	Animais (nº de mortes)	Sobrevida(%)
Salina	2	80%
SM-2	2	80%
SM-3	-	100 %

Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da Pesquisa (2020). **Legenda:** A maior taxa de mortalidade ocorreu nos grupos Salina e SM-2. A maior taxa de sobrevida foi encontrada no grupo SM-3.

6.1.2 Alterações comportamentais

Para saber se o uso dos derivados em dose única ou repetidas poderia causar alterações no comportamento que poderiam estar relacionadas à taxa de mortalidade, as alterações comportamentais durante os 14 dias foram avaliadas (**Tabela 2**).

Os grupos SM-2 e SM-3 apresentaram alterações comportamentais de maneira semelhante ao grupo controle Salina. Não houve animais que apresentassem contorção abdominal e pulsão sexual.

Tabela 2: Alterações comportamentais relativas dos animais no ensaio de segurança, toxicidade subcrônica de SM-2 e SM-3.

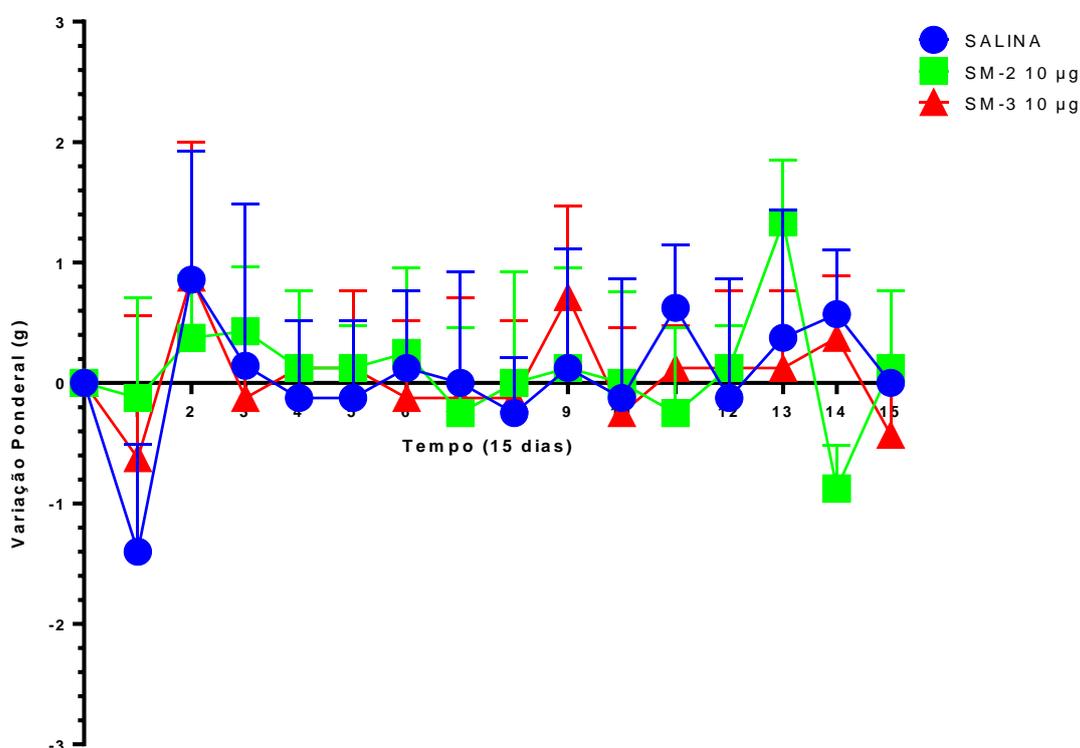
Parâmetros Comportamentais	Número de animais com alteração comportamental por grupo		
	SALINA	SM-2	SM-3
Piloereção	-	1	1
Agressividade	-	1	-
Sonolência	1	-	-
Contorção Abdominal	-	-	-
Lambidas	-	-	-
Cambalhotas	-	1	2
Agitação	-	-	-
Pulsão Sexual	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da pesquisa (2020). **Legenda:** As alterações comportamentais foram observadas durante os 15 minutos seguintes após a administração (v.o) de SM-2, SM-3 ou salina 0,9%.

6.1.3 Alterações do peso corporal

Não ocorreu variação ($p > 0,05$) no peso dos animais que receberam SM-2 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($0,094 \pm 0,11$) e SM-3 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($0,049 \pm 0,094$), quando comparados ao grupo controle Salina ($0,042 \pm 0,12$) durante os 14 dias de avaliação (**FIGURA 8**).

Figura 8. Variação ponderal em camundongos tratados com SM-2 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou SM-3 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) durante 14 dias consecutivos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da Pesquisa (2020). **Legenda:** Os animais foram tratados (v.o), diariamente, com SM-2 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou SM-3 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou solução salina 0,9% (Grupo controle), durante 15 dias e pesados diariamente. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (ANOVA; Tukey).

6.1.4 Avaliação da hepatotoxicidade

O tratamento por 14 dias consecutivos com o SM-2 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou SM-3 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) não provocou diferenças significativas ($p > 0,05$) nos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) no soro de camundongos machos, quando comparados com o grupo dos animais que receberam apenas salina 0,9% (**TABELA 3**).

Tabela 3: Níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT), asparto aminotransferase (AST) em soro de camundongos machos (*Mus musculus*) tratados com SM-2 e SM-3 por 14 dias.

Grupos	Enzima ALT (U/mL)	Enzima AST (U/mL)
Salina (controle)	41,55 ± 1,94	61,21 ± 2,81
SM-2	42,41 ± 0,88	66,3 ± 0,94
SM-3	43,9 ± 0,65	60,55 ± 4,86

Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da Pesquisa (2020). **Legenda:** *p < 0,05 em relação ao grupo Salina. Os dados são representados como média ± E.P.M. (n=8) (ANOVA, Tukey).

6.1.5 Peso relativo dos órgãos dos animais

Foram analisadas possíveis variações no peso dos órgãos (estômago, baço, fígado e rim dos animais), com a finalidade de detectar alguma visceromegalia.

A análise macroscópica dos órgãos dos animais tratados com SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg) não revelou qualquer tipo de alteração. Após avaliação do peso relativo dos órgãos (órgão/peso corporal x 100) foi constatado que não houve redução em relação ao grupo controle (**TABELA 4**).

Tabela 4: Efeito da administração (v.o) com SM-2 (10 µg/kg) ou SM-3 (10 µg/kg) durante 14 dias sobre os pesos relativos dos órgãos de camundongos machos (*Mus musculus*).

Órgãos	Grupos		
	Salina (g)	SM-2 (g)	SM-3 (g)
Estômago	0,0047 ± 0,00056	0,0044 ± 0,00030	0,0047±0,00036
Baço	0,0038 ± 0,00020	0,0039 ± 0,00011	0,0036±0,00016
Fígado	0,0072 ± 0,00116	0,0086 ± 0,00052	0,0083±0,00110
Rim	0,0058 ± 0,00038	0,0054 ± 0,00041	0,0059±0,00028

Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da Pesquisa (2020). **Legenda:** Peso relativo dos órgãos estômago, baço, fígado e rins de camundongos. Grupo controle recebeu apenas veículo (solução salina). Dados são mostrados como média ± E.P.M. *p<0,05 em relação ao grupo Salina (ANOVA, Tukey).

6.1.6 Análise histopatológica

Não foram observados alterações no estômago e rim. Foram observados alterações significativas no parâmetro edema e congestão vascular, no fígado. Entretanto, são alterações consideradas reversíveis (**TABELA 5**).

Tabela 5: Efeito do tratamento com SM-2 e SM-3 na análise histopatológica (H & E) do estômago, fígado e rim.

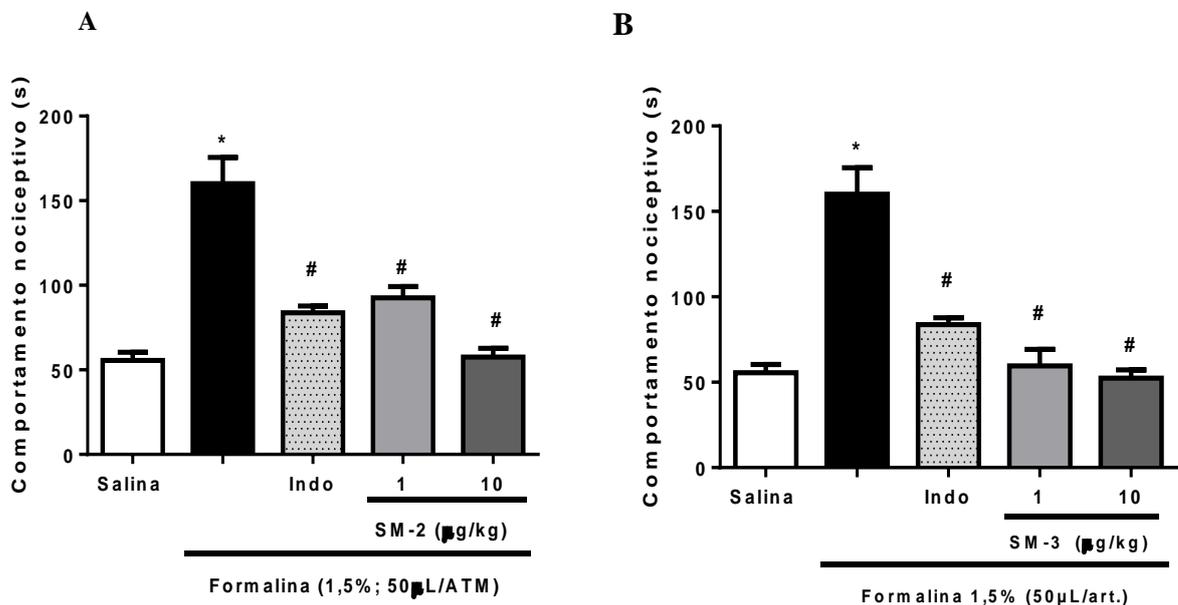
Órgãos / Parâmetros Histopatológicos	Grupos		
	Salina	SM-2	SM-3
Fígado			
Perda de células	0(0-2)	1 (0-1)	1 (0-2)
Edema	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (1-2)*
Hemorragia sinusoides	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)
Congestão vascular	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (1-2)*
Infiltrado inflamatório	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)
Estômago			
Perda de células	0 (0-1)	1(0-1)	1(0-2)
Edema	0 (0-1)	0 (0-2)	1(0-1)
Hemorragia sinusoides	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)
Infiltrado inflamatório	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)
Rim			
Perda de células	0 (0-2)	0 (0-1)	1(0-2)
Edema	0 (0-2)	1(0-2)	1(0-2)
Hemorragia sinusoides	0 (0-1)	1(0-2)	1(0-1)
Infiltrado inflamatório	0 (0-0)	0(0-0)	0 (0-0)
Necrose	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da pesquisa (2020). Os dados representam a média \pm SEM (n =8 para cada tratamento). P > 0,05. ANOVA, Tukey. * p < 0,05 com relação ao grupo salina. **Legenda:** **0-** ausente; **1-** infiltração muito leve; **2-** moderado; **3-** infiltração intensa.

6.2 Estudo da dose-resposta de SM-2 e SM-3 na hipernociceção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos

No grupo Formalina, o comportamento nociceptivo foi significativamente maior ($p < 0,05$) ($160,0 \pm 15,64$) do que o grupo Salina ($55,5 \pm 4,99$). Os animais pré-tratados com SM-2, nas doses de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($92,60 \pm 6,63$) e $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($57,50 \pm 5,22$) (**Figura 9 A**), e SM-3, nas doses de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($59,56 \pm 9,614$) e $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($52,44 \pm 4,785$) (**Figura 9 B**) mostraram redução estatisticamente significante ($p < 0,05$) do comportamento nociceptivo em relação ao grupo Formalina, apresentando resposta semelhante ao grupo Indometacina $5\text{mg}/\text{kg}$ ($83,75 \pm 4,00$) e ao grupo Salina.

Figura 9. Efeito de SM-2 e SM-3 na resposta nociceptiva induzida por formalina 1,5% na ATM de ratos. A: SM-2 (1 e $10 \mu\text{g}/\text{kg}$) reduziu a hipernociceção inflamatória induzida por formalina. B: SM-3 (1 e $10 \mu\text{g}/\text{kg}$) reduziu a hipernociceção inflamatória induzida por formalina. Os dados representam a média \pm E.P.M. das respostas comportamentais nociceptivas por um período de 45 minutos.* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Games-Howelltest).

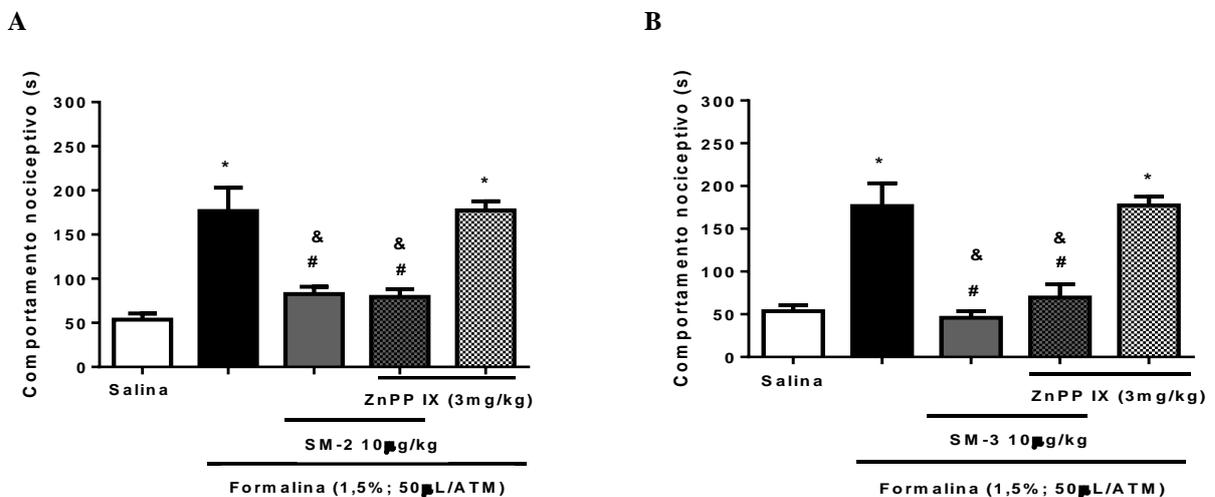


Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da pesquisa.

6.3 Envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva do SM-2 e SM-3 na hipernociceção inflamatória Induzida por Formalina na ATM de ratos

A fim de avaliar o envolvimento da via da HO-1 no efeito de SM-2 e SM-3, um grupo de animais foi pré-tratado (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg/kg) e, após trinta minutos, com SM-2 (10 µg/kg) ou SM-3 (10 µg/kg). O uso de ZnPP-IX (3 mg/kg), inibidor seletivo da hemeoxigenase-1 (HO-1), não alterou comportamento nociceptivo ($177,3 \pm 10,3$) ($p > 0,05$), quando comparado ao grupo formalina. Nos grupos SM-2 ($79,40 \pm 8,66$) e SM-3 ($69,6 \pm 15,41$), o pré-tratamento com ZnPP-IX não foram capaz de reverter o efeito antinociceptivo na ATM induzido por formalina, quando comparado aos grupos SM-2 ($82,5 \pm 8,29$) (**Figura 10 A**) e SM-3 ($45,75 \pm 7,87$) (**Figura 10 B**), respectivamente. O uso de ZnPP-IX (3 mg/kg), inibidor seletivo da hemeoxigenase-1 (HO-1), não alterou comportamento nociceptivo ($177,3 \pm 10,3$) ($p > 0,05$), quando comparado ao grupo formalina. Este resultado sugere que o efeito antinociceptivo de SM-2 (10 µg / kg) e SM-3 (10 µg / kg) não depende em parte da indução de HO-1.

Figura 10. Envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva dos compostos semissintéticos SM-2 e SM-3 na hipernociceção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. A injeção (i.art.) de formalina (1,5 %; 50 µL) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. A: O pré-tratamento com zinco protoporfirina IX (ZnPP IX; 3 mg / kg) não reverteu o efeito de SM-2 (10 µg/kg). B: O pré-tratamento com zinco protoporfirina IX (ZnPP IX; 3 mg / kg) não reverteu o efeito de SM-3 (10 µg/kg). Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina; # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina; & $p < 0,05$ em relação ao grupo controle positivo ZnPP-IX (ANOVA, Games- Howelltest).

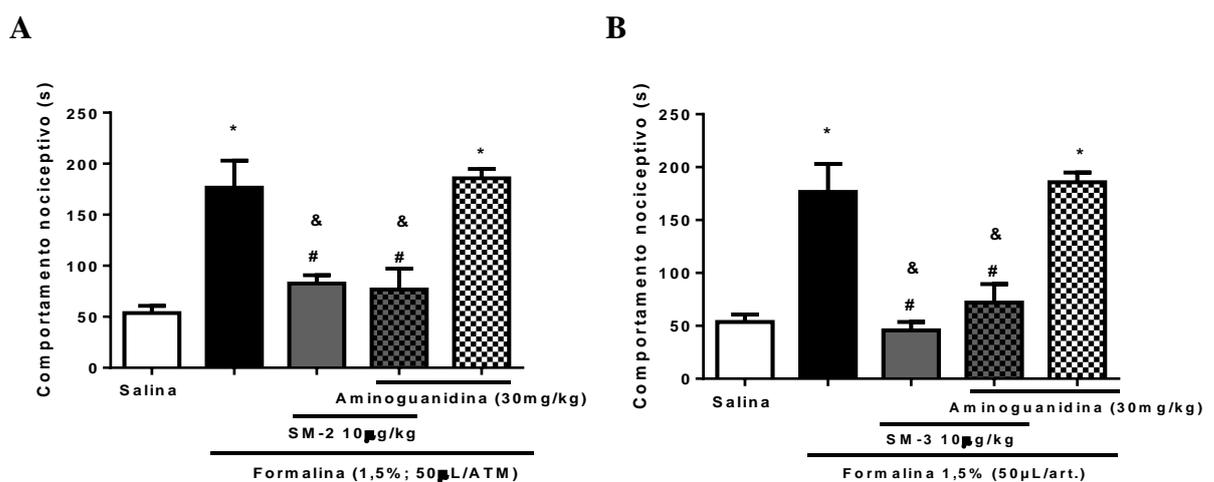


Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da pesquisa.

6.4 Envolvimento do Óxido Nítrico Na Atividade Antinociceptiva de SM-2 e SM-3 Na Hipernociceção Inflamatória Induzida Por Formalina Na ATM De Ratos

Para avaliar o envolvimento do NO no efeito de SM-2 e SM-3, um grupo de animais foi pré-tratado (i.p.) com aminoguanidina (30 mg/kg) e, após trinta minutos, com SM-2 (10µg/kg) ou SM-3 (10µg/kg). O controle positivo aminoguanidina (30 mg/kg), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), não alterou comportamento nociceptivo (185,8±9,0) ($p > 0,05$), quando comparado ao grupo formalina. Nos grupos SM-2 (76,75 ± 20,42) e SM-3 (72,00± 17,57), o pré-tratamento com aminoguanidina não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo, quando comparado aos grupos SM-2 (82,5 ± 8,29) (**Figura 11 A**) e SM-3 (45,75±7,87) (**Figura 11 B**), respectivamente. Este resultado sugere que o efeito antinociceptivo de SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg /kg) não dependem em parte da indução de NO.

Figura 11. Envolvimento do NO na atividade antinociceptiva de SM-2 e SM-3 na hipernociceção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Indometacina, SM-2 e SM-3 (10µg/kg) reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. A: Aminoguanidina (30 mg/kg) não reverteu o efeito de SM-2. B: Aminoguanidina (30 mg/kg) não reverteu o efeito de SM-3. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham; # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina; & $p < 0,05$ em relação ao grupo controle positivo aminoguanidina (ANOVA, Games-Howelltest).



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da pesquisa.

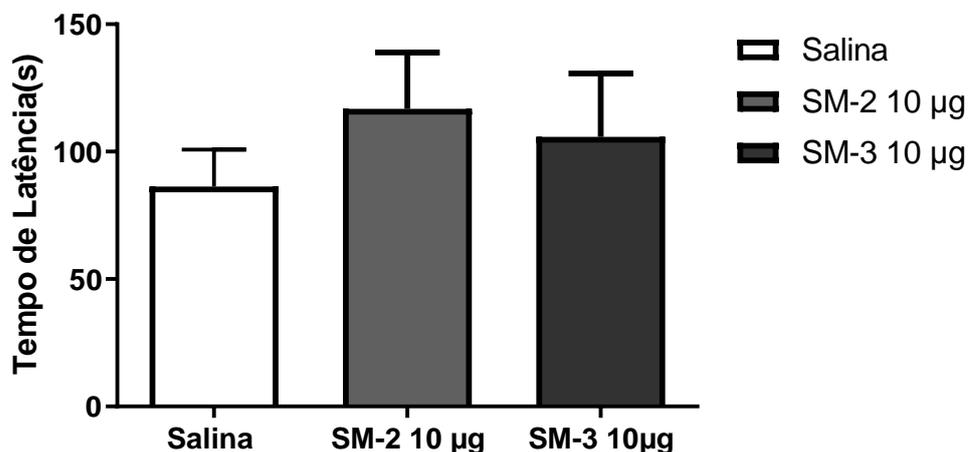
6.5 Efeito do composto semissintético SM-2 e SM-3 no teste do *Rotarod*

Para avaliar se SM-2 e SM-3 poderia causar letargia, sonolência, relaxamento na musculatura ou desordem na coordenação motora que implicasse na resposta analgésica, foi realizado o teste de *Rotarod*. As doses usadas foram SM-2 10µg/kg e SM-3 10µg/kg.

Os grupos SM-2 ($116,8 \pm 11,2$) e SM-3 ($116,0 \pm 10,07$) tiveram maiores tempos de latência do que o grupo Salina ($87,20 \pm 5,739$), o que significa que os derivados não apresentaram efeito ansiolítico (**FIGURA 12**).

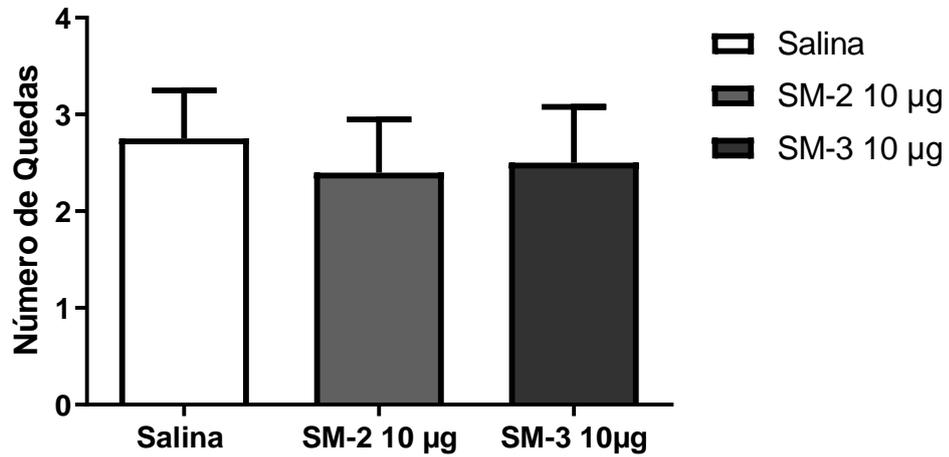
Em relação ao número de quedas, os animais tratados com os semissintéticos SM-2 ($2,4 \pm 0,24$) e SM-3 ($2,5 \pm 0,28$) apresentaram menor número de quedas quando comparados ao grupo tratado com salina ($2,75 \pm 0,25$), sem diferença estatisticamente significativa (**FIGURA 13**).

Figura 12. Efeito da administração aguda de SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg) em ratos submetidos ao teste *Rotarod* (tempo de latência). Os animais dos grupos SM-2 e SM-3 não reduziram o tempo de latência em comparação aos do grupo Salina. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, Tukey).



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da pesquisa (2020).

Figura 13. Efeito da administração aguda de SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg) em ratos submetidos ao teste *Rotarod* (número de quedas). Os animais dos grupos SM-2 e SM-3 tiveram menor número de quedas do aparelho em comparação aos do grupo Salina. Não houve diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo Salina (ANOVA, Tukey).



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da pesquisa (2020).

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi descrito, pela primeira vez, análises biológicas de dois compostos semissintéticos, SM-2 e SM-3, obtidos a partir da estemodina (SM-1), um diterpeno estemodano, isolado das folhas de *Stemodia maritima* Linn.

Sabe-se que o conhecimento construído pela medicina popular forneceu a base para a investigação e produção racional de medicamentos baseados em produtos naturais. *Stemodia maritima* Linn apresenta amplo uso pela medicina popular para dor de estômago, retenção de líquido, ação antiviral, citotóxica e larvicida (RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). De fato, as atividades biológicas dessa planta estão sendo cada vez mais pesquisadas, já tendo sido evidenciadas ações antiinflamatória, antinociceptiva (AZEVEDO, 2019), antidepressiva (SOUSA, 2017) e antirreabsortiva (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

Teixeira *et al.* (2017), no modelo de periodontite, avaliou e comprovou propriedades antiinflamatória, antioxidante e inibição da perda óssea alveolar da *Stemodia maritima* L., visto que *S. maritima* reduziu os níveis de citocinas, de estresse oxidativo e a transcrição dos genes pró-inflamatórios. Além desses estudos, Silva *et al.* (2014) verificou, *in vitro*, potencial efeito antioxidante e antimicrobiano de compostos isolados (stemodina, stemodinoside B e crenatoside) da planta *Stemodia maritima* Linn.

Nesse contexto, ressalta-se que pesquisas com plantas visando o uso farmacológico e a investigação de suas atividades biológicas tem sido bastante difundida no meio científico, com finalidade de descobrir novas substâncias com potenciais efeitos terapêuticos para as mais variadas doenças (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Os produtos naturais, com destaque nas plantas, detêm uma diversidade estrutural importante para formulação de novos fármacos. Essa diversidade ocorre devido à produção de metabólitos secundários, como estemodina, produzidas no metabolismo da planta como forma adaptativa ao ambiente e condições da natureza, como mudanças no clima, radiação, quantidade de nutrientes, infecção, competição e defesa contra predadores (AZEVEDO, 2019; ZHAO *et al.*, 2019; YÑIGEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2019).

Entretanto, embora produtos naturais inalterados, como constituintes químicos de plantas, continuem a desempenhar um importante papel na descoberta de novos fármacos, eles estão sendo amplamente superados por seus análogos, que são obtidos através de processos químicos combinatórios, baseados em modelagem molecular computacional, design racional e síntese, com modificações que tentam minimizar toxicidade, irritação gástrica, lesões

no sistema nervoso, hemorragias, irritação na mucosa bucal, entre outros (NEWMAN; CRAGG, 2016; LI; LOU, 2018).

O estudo da dor para identificar os mecanismos neurobiológicos e neurofisiológicos subjacentes à sua transmissão através dos sistemas nervoso periférico e central baseou-se amplamente na modelagem animal por centenas de anos (LARSON *et al.*, 2019). De fato, sabe-se que existe uma crescente necessidade de testes experimentais em modelos animais com o intuito de avaliar o potencial antinociceptivo de novas substâncias capazes de impedir que o estímulo doloroso alcance o SNC e que ao mesmo tempo causem o mínimo de efeitos colaterais (ARAUJO FILHO *et al.*, 2018).

Nesse contexto, foi descrito neste estudo a toxicidade *in vivo* dos dois derivados semissintéticos (SM-2 e SM-3) obtidos a partir da estemodina (SM-1) isolado das folhas de *Stemodia marítima* Linn. Adicionalmente, foi avaliada a hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por formalina e subsequente foi avaliado o comprometimento da atividade motora por meio do *Rotarod*.

Os ensaios de toxicidade constituem significativo passo para avaliação das características tóxicas de uma substância (GHOSH *et al.*, 2017). No estudo de toxicidade, com os compostos SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg), houve a perda de dois animais do grupo salina e do grupo SM-2, sendo a maior taxa de sobrevivência relatada no grupo SM-3. Na observação dos parâmetros descritos no protocolo comportamental, não foi evidenciado nenhum tipo de alteração durante o período de observação, quando comparados ao grupo Salina.

Na toxicidade pré-clínica, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos considerando a redução na massa corporal, além da redução do desenvolvimento ponderal dos animais experimentais, alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (VAL *et al.*, 2018; RAZA *et al.*, 2002; TEO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2018; GONZALEZ e SILVA, 2003).

Nesse estudo, não foram observadas alterações na relação perda/ganho de peso corporal dos animais submetidos aos ensaios de toxicidade com a administração dos compostos SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg), em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina 0,9%. Esses dados estão de acordo com aqueles preconizados pela OECD 420, os quais determinam uma variação máxima de 20% do peso inicial destes animais para que uma substância seja considerada não tóxica. De forma semelhante, também não foram

observadas variações significativas no peso dos órgãos em análise (fígado, estômago, rins) dos animais submetidos aos ensaios de toxicidade.

Visto a importância do fígado na biotransformação das drogas, e deste constituir um dos órgãos mais suscetíveis à ação de agentes tóxicos, torna-se fundamental a avaliação da função hepática. De fato, existem muitos efeitos tóxicos de plantas medicinais e de seus metabólitos, sendo a hepatotoxicidade uma das principais preocupações em decorrência do papel do fígado no metabolismo de drogas e de ser um órgão essencial ao funcionamento do organismo (Xue *et al.*, 2014). Além disso, a avaliação dos danos ao fígado em pesquisas básicas de toxicologia e em testes de toxicidade pré-clínica é geralmente avaliada por parâmetros bioquímicos séricos antes da confirmação por histopatologia (RAMAIAH, 2007; RAMAIAH, 2011).

Nesse contexto, as análises dos parâmetros bioquímicos das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas. Visto que os aumentos nos níveis dessas enzimas no soro estão associados com a toxicidade do fígado pelas drogas ou hepatotoxina. De fato, sabe-se que uma droga não provoca dano algum ao fígado sem interferir com a atividade normal dessas enzimas (KASMANI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; OZER *et al.*, 2008; RAMAIAH, 2011; SILVA *et al.*, 2005). No presente estudo, observou-se que os parâmetros bioquímicos, AST e ALT, não sofreram nenhuma alteração significativa quando comparados ao grupo controle Salina. Além desses parâmetros, utilizou-se para esse ensaio de toxicidade o estudo histopatológico, não sendo detectado nenhuma alteração irreversível nos órgãos, fígado, estômago e rim, quanto aos parâmetros avaliados, perda de células, edema, dano hemorrágico, congestão vascular e células inflamatórias. Esses resultados indicam que os produtos testados não geram toxicidade sistêmica nas condições avaliadas, pois não foram observados sinais de toxicidade por meio das análises realizadas durante os ensaios de toxicidade aguda e subcrônica, assim, apresentando biocompatibilidade *in vivo*, com um potencial segurança farmacológica, segundo os critérios da norma ISO 10993-11.

Corroboram com esses dados os resultados obtidos no estudo realizado por Teixeira *et al.* (2017) utilizando análises bioquímicas e histopatológicas, ao mostrar que a administração de *Stemodia maritima* (5mg/kg) não promoveu nenhum sinal de toxicidade quando administrada por 11 dias consecutivos. Entretanto, salienta-se que os produtos naturais são constituídos por uma vasta diversidade de compostos químicos, os quais podem exercer diferentes efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos no organismo (RITTER *et al.*, 2002).

Subsequente ao ensaio de toxicidade foi avaliada a hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por formalina, que é um modelo de estudo animal bem validado e amplamente utilizado na literatura para o estudo experimental da dor facial profunda. (ALVES *et al.*, 2017; VAL *et al.*, 2014; RIVANOR *et al.*, 2014; RIVANOR, 2017; COURA *et al.*, 2017; ARAUJO *et al.*, 2017; AZEVEDO, 2019). A formalina, quando aplicada na ATM, induz um comportamento nociceptivo de fase única de esfregar a região orofacial e recuar a cabeça rapidamente (ROVERONI *et al.*, 2001). Os modelos experimentais de dor na ATM simulam os sintomas ou sinais de dor ou degeneração da ATM usando agentes químicos e inflamatórios, manipulação cirúrgica ou carregamento mecânico da ATM (SPERRY *et al.*, 2019).

Assim, avaliando os resultados obtidos nos experimentos dessa pesquisa, utilizando o modelo experimental de hipernocicepção inflamatória aguda na ATM induzida por formalina, percebeu-se que o pré-tratamento com as doses de SM-2 (1 e 10 µg/kg) e SM-3 (1 e 10 µg/kg) reduziram o comportamento nociceptivo. Nessa perspectiva, corroboram com esses dados os resultados obtidos por Azevedo (2019), utilizando o mesmo modelo experimental de hipernocicepção inflamatória aguda na ATM induzida por formalina, no qual os grupos pré-tratado com *Stemodia maritima* (10 µg/kg) e o grupo pré-tratado com o diterpeno estemodina (1 µg/kg) reduziram o comportamento nociceptivo de forma estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo Formalina.

Ademais, com a perspectiva de elucidar o possível mecanismo de ação na modulação farmacológica de SM-2 e SM-3, avaliamos o possível envolvimento da via HO-1, utilizando o inibidor da enzima HO-1, zinco protoporfirina IX (ZnPP-IX). Observamos que o ZnPP-IX não reverteu o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg), mostrando, assim, que o efeito antinociceptivo desses compostos semissintéticos não ocorrem por meio da ativação da HO-1.

Sabe-se que, nos últimos anos, muitos estudos indicam uma ligação entre HO-1 e inflamação em articulação (BENALLAOUA *et al.*, 2007; CHAVES *et al.*, 2018; KOBAYASHI *et al.*, 2006). Nesse contexto, Chaves *et al.* (2018) demonstraram que a expressão de HO-1 e a produção de seus metabólitos, CO e BVD, têm consequências antinociceptivas e antiinflamatórias, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias da dor inflamatória da ATM. Ademais, observaram que o pré-tratamento com ZnPP-IX, um inibidor específico de HO-1, potencializa a hipernocicepção inflamatória.

Adicionalmente, para investigar a participação do NO sobre o efeito do pré-tratamento com SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg) na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos, utilizamos aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), previamente à administração de SM-2 e SM-3.

Sabe-se que óxido nítrico sintase induzível (iNOS), é um mediador chave da ativação imunológica e da inflamação, participando de um número considerável de doenças humanas com componentes inflamatórios. A iNOS superexpressa ou desregulada tem sido implicada em várias patologias, incluindo sepse, câncer, neurodegeneração e vários tipos de dor, em modelos animais de dor neuropática, a regulação positiva da iNOS contribui para as reações inflamatórias locais (CINELLI *et al.*, 2020).

Nesse contexto, muitos inibidores potentes de iNOS com alta seletividade sobre isoformas de NOS relacionadas, NOS neuronal e NOS endotelial foram descobertos e essas drogas têm se mostrado promissoras em modelos animais de endotoxemia, dor inflamatória e neuropática, artrite e outros distúrbios (CINELLI, *et. al.* 2020).

Nesse estudo, observamos que a aminoguanidina não reverteu o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg), mostrando, assim, que o efeito antinociceptivo desses compostos semissintéticos não ocorre por meio da ativação do NO.

Adicionalmente a estas análises foram realizadas avaliação de neurotoxicidade por meio do teste de Rotarod, que é utilizado para avaliar a motricidade de pequenos animais, sendo um bom modelo coadjuvante em experimentos de osteoartrite. Quando a quantidade de rotações por minuto (rpm) torna-se alta, ela exige adequada performance do animal, presença de alguma alteração na motricidade, o mesmo não consegue se manter sobre o cilindro (DUNHAM; MIYA, 1957; PIEL *et al.*, 2014).

Nesse contexto, não detectamos distúrbios na atividade locomotora ou desempenho motor em animais tratados com SM-2 (10 µg/kg) e SM-3 (10 µg/kg). Os grupos Salina, SM-2 e SM-3 tiveram tempos de latência e número de quedas semelhantes, o que sugere que os compostos na dose efetiva não têm ação relaxante muscular ou depressora central nos modelos de nocicepção usados em nosso estudo.

Sousa (2017) obteve resultados semelhantes em estudo comportamental com *Stemodia maritima* L., em que foram realizados testes de Labirinto, de nado forçado, teste de campo aberto, com ratos, não sendo detectadas alterações no comportamento desses animais. Ademais, nesse mesmo estudo foram realizadas análise do peso de órgãos (fígado, coração e rins), não revelando alterações significativas de toxicidade.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que SM-2 e SM-3 são seguros e apresentam efeitos antinociceptivos em modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos, não apresentando atividade através das vias da HO-1 e NO. Portanto, esses dados são promissores para a prática clínica, pois oferecem evidências científicas que comprovam o potencial destes compostos semissintéticos para a terapia farmacológica da dor e inflamação na ATM em humanos, como abordagem alternativa para os indivíduos portadores de dor orofacial e DTM, que não respondem às terapias convencionais.

Sendo, adicionalmente, necessário investigar outras vias metabólicas, alvos celulares e moleculares, para maior compreensão dos mecanismos de ação, possibilitando uma melhor efetividade de seu uso.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J., CONNELL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **European journal of pharmacology**, v.126, n.1-2, p.141-144, 1986.
- ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phase of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, p. 91-102, 1995.
- ACRI, T. M., SHIN, K., SEOL, D., LAIRD, N. Z., SONG, I., GEARY, S. M., CHAKKA, J. L., MARTIN, J. A., & SALEM, A. K. Tissue Engineering for the Temporomandibular Joint. **Advanced healthcare materials**, v.8, n. e1801236. 2019.
- ALJANCIC, I.; STANKOVIC, M.; TESEVIC, V.; VUJISIC, L.; VAJS, V.; MILOSAVLJEVIC, S. Protective effect on human lymphocytes of some flavonoids isolated from two Achillea species. **Natural product communications**, v. 5, p. 32-729, 2010.
- ALLEN, J. G.; COLEGATE, S. M.; MITCHELL, A. A.; MULDER, R. J.; RAISBECK, M. F. The bioactivity-guided isolation and structural identification of toxic cucurbitacin steroidal glucosides from *Stemodiakingii*. **Phytochemical analysis**, v. 17, p. 226-235, 2006.
- ALLISON, B. J.; ALLENBY, M. C.; BRYANT, S. S.; MIN, J. E.; HIEROMNIMON, M.; JOYNER, P. M. Antibacterial activity of fractions from three Chumash medicinal plant extracts and in vitro inhibition of the enzyme enoyl reductase by the flavonoid jaceosidin. **Natural product research**, v. 6, p. 707-712, 2017.
- ALVES, S. M., ABREU, S. C., LEMOS, J. C., GOMES, F., ALVES, S. M., DO VAL, D. R., FREITAS, R. S., PEREIRA, K., DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V., DE CASTRO BRITO, G. A., BEZERRA, M. M., CRISTINO-FILHO, G., & CHAVES, H. V. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF- α inhibition. **Pharmacological reports**, v.69(4), p.764–772, 2017.
- ANANTHAN, S.; BENOLIEL, R. Chronic orofacial pain. **Journal of neural transmission** (Vienna). V.127, n.4, p.575-588. 2020.
- ARAÚJO-FILHO, H. G., PEREIRA, E., CAMPOS, A. R., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., & QUINTANS, J. (2018). Chronic orofacial pain animal models - progress and challenges. **Expert opinion on drug discovery**, v.13, n.10, p.949–964. 2018.
- ARAÚJO, I. W., CHAVES, H. V., PACHÊCO, J. M., VAL, D. R., VIEIRA, L. V., SANTOS, R., FREITAS, R. S., RIVANOR, R. L., MONTEIRO, V. S., CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T., BEZERRA, M. M., & BENEVIDES, N. M. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieriafiliformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160-167, 2017.

AZEVEDO, J. L. M. Efeito do extrato etanólico das folhas da *Stemodiamaritima* Linn. e do diterpenoestemodina em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda na articulação temporomandibular de ratos. 2019. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

BARBOSA, V. C. S.; BARBOSA, F. S. Fisioterapia nas disfunções temporomandibulares. São Paulo: **Phorte**, 2009.

BENALLAOUA, M., FRANÇOIS, M., BATTEUX, F., THELIER, N., SHYY, J. Y., FITTING, C., TSAGRIS, L., BOCZKOWSKI, J., SAVOURET, J. F., CORVOL, M. T., POIRAUDEAU, S., & RANNOU, F. Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. **Arthritis and rheumatism**, v.56, n.8, p 2585–2594, 2007.

BERTOLI, F.M.P.; BRUZAMOLIN, C.D.; PIZZATTO, E.; LOSSO, E.M.; BRANCHER, J.A.; SOUZA, J.F.; Prevalence of diagnosed temporomandibular disorders: A cross-sectional study in Brazilian adolescents. **PLoS One**. v.13, n.2, p.e0192254, Feb.2018.

BEZERRA, M. M. et al. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 374, n. 4, p. 265–273, 2007.

BLANCO-AGUILERA A, BLANCO-AGUILERA E, SERRANO-DEL-ROSAL R, BIEDMA-VELÁZQUEZ L, RODRIGUEZ-TORRONTERAS A, SEGURA-SAINT-GERONS R, et al. Influence of clinical and psychological variables upon the oral health-related quality of life in patients with temporomandibular disorders. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**.v.22,n.6, p.669-78, Nov, 2017.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229–239, Jan. 2010.

BREDT, D. S., HWANG, P. M., GLATT, C. E., LOWENSTEIN, C., REED, R. R., & SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 714-718, 1991.

BUCHANAN, G. O.; REESE, P. B. Biotransformation of diterpenes and diterpene derivatives by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Phytochemistry**, v. 56, p. 141-151, 2001.

CAIRNS, B., LIST, T., MICHELOTTI, A., OHRBACH, R., SVENSSON, P. JOR-CORE recommendations on rehabilitation of temporomandibular disorders. **Journal of oral rehabilitation**, v. 37, n. 6, p. 481–9, 11 maio 2010.

CAIRNS, B. E.; REN, K.; TAMBELI, C. H. Musculoskeletal orofacial pain mechanisms: insights from animal models. In: SESSLE, B. J. (Ed.). **Orofacial Pain**. [s.l.] IASP Press., p. 351–372. 2014

CARLINI E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Rev. Ass. Bras. Psiquiatria**, v.1, p.25-31, 1979.

CARRARA, S. V.; CONTI, P. C. R.; BARBOSA, J. S. Termo do 1º consenso em disfunção temporomandibular e dor orofacial. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 15, n.3, p. 114-120, 2010.

CHAMY, M. C.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GAMBARO, V. Stemodane diterpenoids from *Stemodia chilensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1719-1721, 1991.

CHEN, A. R. M.; RUDDOCK, P. L. D.; LAMM, A. S.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Stemodane and stemarane diterpenoid hydroxylation by *Mucor plumbeus* and *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1898-1902, 2005.

CHEN, B. L.; WANG, Y. J.; GUO, H.; ZENG, G. Y. Design, synthesis, and biological evaluation of crenatoside analogues as novel influenza neuraminidase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 109, p. 199-205, 2016.

CHAVES, H.V.; LEITÃO, A.K.A.; FARRAPO, A.R.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.C. Papel de mediadores inflamatórios na dor, na inflamação e em processos degenerativos da articulação temporomandibular. **JBA**. Jornal brasileiro de oclusão, ATM & Dor orofacial, v. 5, p. 76-84, 2005

CHAVES, H.V.; RIBEIRO, R.; DE SOUZA, A.M.; RODRIGUES E SILVA, A.A.; GOMES, A.S.; VALE, M.L.; BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**. v. 2011, p. 1-11, jan. 2011.

CHAVES, H. V., DO VAL, D. R., RIBEIRO, K. A., LEMOS, J. C., SOUZA, R. B., GOMES, F., DA CUNHA, R., DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V., FILHO, G. C., DE SOUZA, M., BEZERRA, M. M., & DE CASTRO BRITO, G. A. Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research**, v.67(5), p.407–422. 2018

CHICHORRO, J. G.; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 613–626, 2017.

CINELLI, M. A., DO, H. T., MILEY, G. P., & SILVERMAN, R. B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal research reviews**, v.40, n.1, 2020.

CLAVELOU, P., PAJOT, J., DALLEL, R., & RABOISSON, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience Letters**. v. 103, n.3, p. 349-353, set. 1989.

CLAVELOU, P.; DALLEL, R.; ORLIAGUET, T.; WODA, A.; RABOISSON, P. The orofacial formalin test in rats: Effects of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, p. 295-301, 1995.

COURA, C. O., CHAVES, H. V., DO VAL, D. R., VIEIRA, L. V., SILVEIRA, F. D., DOS SANTOS LOPES, F. M., GOMES, F. I., FROTA, A. F., SOUZA, R. B., CLEMENTE-

NAPIMOGA, J. T., BEZERRA, M. M., & BENEVIDES, N. M. Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et BIOPHYSICA ACTA**, V. 1830, N. 6, P.3670-3695, 2013.

CUNHA, F.Q.; TEIXERA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems—cyclic AMP and cyclic GMP—on inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**. v. 127, n. 3, p. 671-678, 1999.

DALLEL, R., RABOISSON, P., CLAVELOU, P., SAADE, M., & WODA, A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, v. 61, n. 1, p. 11–6, abr. 1995.

DA SILVA, V. C., DE ARAÚJO, A. A., DE SOUZA ARAÚJO, D. F., SOUZA LIMA, M., VASCONCELOS, R. C., DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F., LANGASNNER, S., DE FREITAS FERNANDES PEDROSA, M., DE MEDEIROS, C., & GUERRA, G. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of the Aqueous Extract from *Ipomoea asarifolia* in DNBS-Induced Colitis in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, dec, 2018.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 299-315, 2015.

DE LEEUW, R.; KLASSER, G.D. Diagnosis and management of tmjds. In: de Leeuw R, Klasser GD, editors. **Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis and management**. 5th ed. Chicago: Quintessence; p. 129–30. 2013.

DE LEEUW R, KLASSER G, editors. **Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis, and management**. 6th ed. Chicago: Quintessence; 2018.

DE MELO JÚNIOR, P. C., AROUCHA, J. M. C. N. L., ARNAUD, M., LIMA, M. G. DE S., GOMES, S. G. F., XIMENES, R., ... CALDAS, A. DE F. Prevalence of TMD and level of chronic pain in a group of Brazilian adolescents. **PLOS ONE**, v.14, n.2 ,2019.

DE ROSSI, S. S. Orofacial pain: A primer. **Dental Clinics of North America**, v. 57, n. 3, p. 383–392, 2013.

DE ROSSI, S. S., GREENBERG, M. S., LIU, F., & STEINKELER, A. Temporomandibular Disorders: Evaluation and Management. **The Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 6, p. 1353-1384, nov. 2014.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats & Mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v.46, n.3, 1957.

DUBUISSON, D; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. v.4, n. 2, p. 161-74, 1977.

FACCHINETTI, M. M. Heme Oxygenase-1. **Antioxidants & Redox Signaling**., v.32, n.17, p. 1239-1242, Jun 10, 2020.

FAN, W., HUANG, F., WU, Z., ZHU, X., LI, D., & HE, H. . The role of nitric oxide in orofacial pain. **Nitric Oxide**, v.26,n.1,p. 32–37, 2012.

FERREIRA, L. A., GROSSMANN, E., JANUZZI, E., DE PAULA, M. V., & CARVALHO, A. C. Diagnosis of temporomandibular joint disorders: indication of imaging exams. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 82, n. 3, 341–352. 2016.

FINE, M. Quantifying the impact of NSAID-associated adverse events. **The American journal of managed care**, v. 19, n. 14 Suppl, p. s267-72, nov. 2013.

FREITAS, R. S.; DO VAL, D. R.; FERNANDES, M. E., GOMES, F. I., DE LACERDA, J. T., SANTIGADELHA, T., DE ALMEIDA GADELHA, C. A., DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V., CRISTINO-FILHO, G., PEREIRA, K. M., DE CASTRO BRITO, G. A., BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and *tnf- α* and *il-1 β* suppression. **International Immunopharmacology**. v.38, p. 313-323, 2016.

GAUER, R.L; SEMIDEY, M.J. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. **American family physician**, v. 91, n.6, p. 378-86, 2015.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C.*Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*. **Porto Alegre: UFRGS**, p.179-198. 2003

GHOSH, N., SANDUR, R., GHOSH, D., ROY, S., & JANADRI, S. Acute, 28 days sub acute and genotoxic profiling of Quercetin-Magnesium complex in Swiss albino mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 279-291, 2017.

GREENE, C. S. Managing the Care of Patients With Temporomandibular Disorders. **The Journal of the American Dental Association**, v. 141, n. 9, p. 1086–1088, 2010.

GUPTA, R., MOHAN, V., MAHAY, P., YADAV, P.K. Orofacial Pain: A Review. **Dentistry**, v. 6, p. 3, 2016.

HABIB, S. R., AL RIFAIY, M. Q., AWAN, K. H., ALSAIF, A., ALSHALAN, A., & ALTOKAIS, Y. Prevalence and severity of temporomandibular disorders among university students in Riyadh. **The Saudi Dental Journal**, v. 27, p. 125-130, 2015.

HANSON, J. R.; REESE, P. B.; TAKAHASHI, J. A.; WILSON, M. R. Biotransformation of some stemodan e diterpenoids by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1391-1393, 1994.

HASSLER, M. World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World. In: ROSKOV, Y. et al. (Eds.). **Leiden: Naturalis**, 2017. .

HÄGGMAN-HENRIKSON, B., ALSTERGREN, P., DAVIDSON, T., HÖGESTÄTT, E. D., ÖSTLUND, P., TRANAEUS, S., VITOLS, S., & LIST, T. Pharmacological treatment of orofacial pain - health technology assessment including a systematic review with network meta-analysis. **Journal of oral rehabilitation**, n. 10, v. 44, p. 800–826, 2017.

HAYASHI, S.; TAKAMIYA, R.; YAMAGUCHI, T.; MATSUMOTO, K.; TOJO, S. J.; TAMATANI, T.; KITAJIMA, M.; MAKINO, N.; ISHIMURA, Y.; & SUEMATSU, M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. **Circulation research**, v. 85, n.8, p. 663–671. 1999.

HEIR G. M. The Efficacy of Pharmacologic Treatment of Temporomandibular Disorders. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v.30, n. 3, p.279–285. 2018.

HUALIN, C., WENLI, X., DAPENG, L., XIJING, L., XIUHUA, P., & QINGFENG, P. The anti-inflammatory mechanism of heme oxygenase-1 induced by hemin in primary rat alveolar macrophages. **Inflammation**, v. 35, n. 3, p. 1087-1093, 2012.

ISO 10993-11. Biological Evaluation of Medical Devices – Parts 11: tests for systemic toxicity. 1. ed. 1992.

JUNG, H. S., JEON, H. B., JEON, I. S., LEE, B. J., YOO, H. W., AHN, D. K., & YOUN, D. H. Preventing extracellular diffusion of trigeminal nitric oxide enhances formalin-induced orofacial pain. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 379-383, 2009.

KASMANI, F. B.; TORSHIZI, M. A. K.; ALLAMEH, A.; SHARIATMADARI, F. A novel aflatoxin-binding Bacillus probiotic: Performance, sérum biochemistry, and immunological parameters in Japanese quail. **Poultry Science**, v. 91, p. 1846–1853, 2012.

KOBAYASHI, H., TAKENO, M., SAITO, T., TAKEDA, Y., KIRINO, Y., NOYORI, K., HAYASHI, T., UEDA, A., & ISHIGATSUBO, Y. Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v.54, n.4, 1132–1142, 2006 .

LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their Interactions. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 10, p. 1109-1116, 2016.

LARSON, C. M., WILCOX, G. L., & FAIRBANKS, C. A. The Study of Pain in Rats and Mice. **Comparative Medicine**, v.69, n.6, p. 555–570,2019.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LI, G.; LOU, H. X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal research reviews**, v. 38, n. 4, p. 1255-1294, 2018.

LIU, X.; CAO, P.; ZHANG, C.; XU, X.; ZHANG, M. Screening and analyzing potential hepatotoxic compounds in the ethanol extract of *Asteris Radix* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 68, p. 51–62, 2012.

LOMAS, J., GURGENCI, T., JACKSON, C., & CAMPBELL, D. Temporomandibular dysfunction. **Australian Journal of General Practice**, v.47, n.4. 2018.

LUCCARINI, P., CHILDERIC, A., GAYDIER, A. M., VOISIN, D., & DALLEL, R. (2006). The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v.7, n.12, 908–914. 2006.

MAGALHÃES, B. G., DE-SOUSA, S. T., DE MELLO, V. V., DA-SILVA-BARBOSA, A. C., DE-ASSIS-MORAIS, M. P., BARBOSA-VASCONCELOS, M. M., & CALDAS-JÚNIOR, A. D. Risk factors for temporomandibular disorder: binary logistic regression analysis. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v.19, n. 3, p. e232-6, maio. 2014.

MARKLUND, S. Temporomandibular disorders: Incidence, course, and risk factors. (Tese) - Department of Odontology, Faculty of Medicine, Umeå University, 2009.

MAINES, M. D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 2, n. 10, p. 2557-2568, 1988.

MOAYEDI, M., HODAIE, M. Trigeminal nerve and white matter brain abnormalities in chronic orofacial pain disorders. **Pain reports**, v. 4n.4,p. 755. 2019.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v.43,n.2,p.109-142, jun 1991.

MONTEIRO, D. R., ZUIM, P. R., PESQUEIRA, A. A., RIBEIRO, P., & GARCIA, A. R. Relation ship between anxiety and chronic orofacial pain of temporomandibular disorder in a group of university students. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 55, n. 3, p. 154–158, 2011.

MOUFTI, M. A., WASSELL, R. W., MEECHAN, J. G., ALLEN, P. F., JOHN, M. T., & STEELE, J. G. The Oral Health Impact Profile: Ranking of items for temporomandibular disorders. **European Journal of Oral Sciences**, v. 119, n. 2, p. 169–174, 2011.

NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Pennsylvania, v. 79, n. 6, p. 629-661, Feb. 2016.

OHRBACH, R., & DWORKIN, S. F. The Evolution of TMD Diagnosis: Past, Present, Future. **Journal of dental research**, v.95, n.10, p.1093–1101, 2016.

OHRBACH, R., & DWORKIN, S. F. AAPT DIAGNOSTIC CRITERIA FOR CHRONIC PAINFUL TEMPOROMANDIBULAR DISORDERS. **The journal of pain: official journal of the American Pain Society**, v.20, n.11, p.1276–1292. 2019.

OKESON, J. P. Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLIVEIRA-FUSARO, M.C.G.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; TEIXEIRA, J.M.; TORRES-CHÁVEZ, K.E.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. 5-HT induces temporomandibular joint nociception in rats through the local release of inflammatory mediators and activation of local β adrenoceptors. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v.102, p. 458–464, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMICS CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 420 OECD Guidelines for Teste of Chemical: Acute Toxicity – fixed dose procedure. dez. 2001.

OTTERBEIN LE, BACH FH, ALAM J, SOARES M, TAO LU H, WYSK M, DAVIS RJ, FLAVELL RA, CHOI AM. Carbon monoxide has antiinflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nature Medicine**. v.6; n.4, p.422–428, 2000.

OZER, J. RATNER, M.; SHAWC, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245 p. 194–205, 2008.

PALMER, R.M. , FERRIGE, A.G. , MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, **Nature**, v.327, n. 6122, p.524–526, june, 1987.

PIEL, M. J.; KROIN, J. S.; VAN WIJNEN, A. J.; KC, R.; & IM, H. J. Pain assessment in animal models of osteoarthritis. **Gene**. v. 537, n.2, p. 184-188, mar., 2014.

PLESH, O., NOONAN, C., BUCHWALD, D. S., GOLDBERG, J., & AFARI, N. Temporomandibular disorder–type pain and migraine headache in women: a preliminary twin study. **Journal of Orofacial Pain**, v.26, p.91–8. 2012.

POLUHA, R. L., CANALES, G. T., COSTA, Y. M., GROSSMANN, E., BONJARDIM, L. R., & CONTI, P. Temporomandibular joint disc displacement with reduction: a review of mechanisms and clinical presentation. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 27, 2019.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219–226, 2004.

RAJA, S. N., CARR, D. B., COHEN, M., FINNERUP, N. B., FLOR, H., GIBSON, S., KEEFE, F. J., MOGIL, J. S., RINGKAMP, M., SLUKA, K. A., SONG, X. J., STEVENS, B., SULLIVAN, M. D., TUTELMAN, P. R., USHIDA, T., & VADER, K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, 23 May. 2020.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1551–1557, 2007.

RAMAIAH, S. K. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug- induced liver injury. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31 p. 161–172, 2011.

RAMOS, E. H. S.; DUARTE, H. S. D.; JIMENEZ, G. C. Perfil toxicológico das fases II e III do exsudato extraído do fruto de Mangifera indica L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n.1, p. 75-87, 2015.

RAZA, M; . SHABANAH, O.A.; GAMAL, T.M.; MAJED, A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.

RENTON T. Chronic orofacial pain. **Oral Diseases**. v.23, n.5, p.566-71. 2017 .

RIVANOR, R. L.C., CHAVES, H. V., DO VAL, D. R., DE FREITAS, A. R., LEMOS, J. C., RODRIGUES, J. A., PEREIRA, K. M., DE ARAÚJO, I. W., BEZERRA, M. M., & BENEVIDES, N. M. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**. v.21, p. 34-43, 2014

RIVANOR, Renata Line da Conceição. Lectina da alga *Caulerpacupressoides*: Caracterização parcial, eficácia e possíveis mecanismos envolvidos na hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular de ratos. 2017. 119 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

ROCHA, F. A. C. DA, ROCHA, J. C. DA S., PEIXOTO, M. E. B., JANCAR, S., CUNHA, F. DE Q., & RIBEIRO, R. DE A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206–217, 2003.

RODRIGUES, F.E.A., LIMA, J.Q., SANTIAGO, G.M.P., MAFEZOLI, J., BRAZ-FILHO, R., ARRIAGA, A.M.C. Diterpene and other Constituents from *Stemodia maritima* (Scrophulariaceae). **J Braz Chem Soc**. 2010.

RODRIGUES, T.; REKER, D.; SCHNEIDER, P. E.; SCHNEIDER, G. Counting on Natural Products for Drug Design. **Nature Chemistry**, Zurich, v. 8, n. 6, p. 531-541, Jun. 2016.

ROSLAND, J. H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**. v.45, n.2, p. 211-216, 1991.

ROVERONI, R. C., PARADA, C. A., CECÍLIA, M., VEIGA, F. A., & TAMBELI, C. H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. **Pain**.v. 94, n.2, p. 185-191, nov. 2001.

RYTER, S.W.; ALAM, J.; CHOI, A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications, **Physiological Reviews**, Pennsylvania, v. 86, n. 2, p. 583-650, Apr. 2006.

RYTER, W. S. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 678, n. 2019, p. 1-11, Dec, 2019.

RUSSELL, F. A.; MULABAGAL, V.; THOMPSON, D. R.; SINHGH-WILMOT, M. A.; REYNOLDS, W. F.; NAIR, M. G.; LANGER, V.; REESE, P. B. Stemodin-derived analogues with lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2361–2368, 2011.

SACHS, D., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺-channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.10, 3680–3685, 2004.

SASSI, F. C., SILVA, A. P. DA, SANTOS, R. K. S., & ANDRADE, C. R. F. DE. Tratamento para disfunções temporomandibulares: uma revisão sistemática. **Audiology - Communication Research**, v.23, 23 abr. 2018.

SCATIGNA, A.V.; SOUZA, V.C. 2020. *Stemodia* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12926>>. Acesso em: 10 Out. 2020

SCHIFFMAN, E., OHRBACH, R., TRUELOVE, E., LOOK, J., ANDERSON, G., GOULET, J. P., LIST, T., SVENSSON, P., GONZALEZ, Y., LOBBEZOO, F., MICHELOTTI, A., BROOKS, S. L., CEUSTERS, W., DRANGSHOLT, M., ETTLIN, D., GAUL, C., GOLDBERG, L. J., HAYTHORNTHWAITE, J. A., HOLLENDER, L., JENSEN, R. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network* and Orofacial Pain Special Interest Group†. **Journal of oral & facial pain and headache**, v. 28, n. 1, p. 6–27, abr. 2014.

SESSA, W. C.; HARRISON, J. K.; BARBER, C. M.; ZENG, D.; DURIEUX, M. E.; D'ANGELO, D. D.; LYNCH, K. R.; PEACH, M. J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **the Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15274-15276, 1992.

SESSLE, B. J. The Neural Basis of Temporomandibular Joint and Masticatory Muscle Pain. **Journal of Orofacial Pain**.v. 13, n.4, p. 238-245, 1999.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v.11,n.1,p. 57–91, 2000.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiology**. v. 71, n. 4, p. 117-136, 2005.

SESSLE, BARRY J.. Mecanismos periféricos e centrais da dor orofacial e suas correlações clínicas. In: ALVES NETO, Onofre et al. **Dor: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, Cap. 14. p. 189-204, 2009.

SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. **International review of neurobiology**. v.97, p.179–206. 2011.

SESSLE, B. J. Temporomandibular disorders: associations and features related to diagnosis and management. **Journal of orofacial pain**, v. 27,n. 1, 2013.

SHIBUTA, K., SUZUKI, I., SHINODA, M., TSUBOI, Y., HONDA, K., SHIMIZU, N., SESSLE, B. J., & IWATA, K. Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. **Brain research**, v. 1451, p.74–86, 2012.

SHIMADA, A., ISHIGAKI, S., MATSUKA, Y., KOMIYAMA, O., TORISU, T., OONO, Y., SATO, H., NAGANAWA, T., MINE, A., YAMAZAKI, Y., OKURA, K., SAKUMA, Y., & SASAKI, K. Effects of exercise therapy on painful temporomandibular disorders. **Journal of oral rehabilitation**. V.46,n.5,p.475-481. Feb, 2019.

SHINODA, M., HAYASHI, Y., KUBO, A., & IWATA, K. Pathophysiological mechanisms of persistent orofacial pain. **Journal of oral science**, v.62, n.2, 131–135, 2020.

SHINODA, MASAMICHI ET AL. “Peripheral and Central Mechanisms of Persistent Orofacial Pain.” *Frontiers in neuroscience* vol. 13 1227. 13 Nov. 2019.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras**, v. 24, n. 4, p. 223-236, 2006.

SILVA, E.J.R., GONÇALVES, E.S., SOUSA, I.M.V., DIMECH, G.S., FRAGA, M.C.C.A., COELHO, M.C.O.C., WANDERLEY, A.G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Rev. bras. farmacogn**, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

SILVA, Francisca Renata Lopes. *Tephrosia toxicaria* Pers. e *Stemodia maritima* Linn.: Estudo químico e atividades biológicas. 2017. 207 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SILVA, L. L. D. DA; NASCIMENTO, M. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Antibacterial activity of labdane diterpenoids from *Stemodia foliosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1291-1293, 2008.

SILVA, W. M. B. da; ASSUNÇÃO, J. C. C.; ARAÚJO, R. M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. New volatile constituents from leaves of *Stemodia trifoliata* (Link.) Reichb. (Schrophulariaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 1, p. 37-41, 2009.

SILVA, W. M. B.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Acylatedmanoyl oxide diterpenes of *Stemodia trifoliata*. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 48, p. 486-489, 2010.

SILVA, F.R.L; RODRIGUES, F.E.A; GOMES, A.R.S; ARRIAGA,A.M.C; MAZEFOLI, J.;LEMOS,L.G;ALMEIDA, M.C.S. et al., PHYTOCHEMICAL STUDY, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *Stemodia maritima*, **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 9, 1474-1478, 2014.

SKOG, C., FJELLNER, J., EKBERG, E., & HÄGGMAN-HENRIKSON, B. Tinnitus as a comorbidity to temporomandibular disorders-A systematic review. **Journal of oral rehabilitation**, v.46, n.1, p. 87–99, 2019.

SLADE, G. D., BAIR, E., GREENSPAN, J. D., DUBNER, R., FILLINGIM, R. B., DIATCHENKO, L., MAIXNER, W., KNOTT, C., & OHRBACH, R. Signs and symptoms of first-onset TMD and sociodemographic predictors of its development: The OPPERA prospective cohort study. **Journal of Pain**, v. 14, n. 12 SUPPL., p. T20–T32.e3, dez. 2013.

SLADE, G. D., SANDERS, A. E., OHRBACH, R., FILLINGIM, R. B., DUBNER, R., GRACEY, R. H., BAIR, E., MAIXNER, W., & GREENSPAN, J. D. Pressure pain thresholds fluctuate with, but do not usefully predict, the clinical course of painful temporomandibular disorder. **Pain**, v.155,n.10, p. 2134–2143. 2014

SLADE, G. D., OHRBACH, R., GREENSPAN, J. D., FILLINGIM, R. B., BAIR, E., SANDERS, A. E., DUBNER, R., DIATCHENKO, L., MELOTO, C. B., SMITH, S., & MAIXNER, W. Painful Temporomandibular Disorder. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 10, p. 1084–1092, 21 set. 2016.

SMITH, S. B., PARISIEN, M., BAIR, E., BELFER, I., CHABOT-DORÉ, A.-J., GRIS, P., DIATCHENKO, L. Genome-wide association reveals contribution of MRAS to painful temporomandibular disorder in males. **PAIN**, 1. v.160, n.3,p.579-591 , March 2019.

SOUSA, R.S. Investigação dos efeitos neurofarmacológicos de *Stemodia maritima* (linn): alterações comportamentais e avaliação do estresse oxidativo. 2017. 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará. Sobral, 2017.

SPERRY, M. M., KARTHA, S., WINKELSTEIN, B. A., & GRANQUIST, E. J. Experimental Methods to Inform Diagnostic Approaches for Painful TMJ **Osteoarthritis**. **Journal of dental research**, v.98, n.4,p.388–397. 2019

SPILLER, F., OLIVEIRA FORMIGA, R., FERNANDES DA SILVA COIMBRA, J., ALVES-FILHO, J. C., CUNHA, T. M., & CUNHA, F. Q. Targeting nitric oxide as a key

modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v.89,p. 32–40. AUG. 2019

TEIXEIRA, A. H., FREIRE, J., DE SOUSA, L., PARENTE, A. T., DE SOUSA, N. A., ARRIAGA, A., LOPES DA SILVA, F. R., MELO, I. M., CASTRO DA SILVA, I. I., PEREIRA, K., GOES, P., COSTA, J., CRISTINO-FILHO, G., PINTO, V., CHAVES, H. V., & BEZERRA, M. M. *Stemodia maritima* L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress, and Alveolar Bone Loss in an Experimental Periodontitis Rat Model. **Frontiers in Physiology** , v. 8, p. 988, 2017.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; & KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

TRIPATHI, P., TRIPATHI, P., KASHYAP, L., & SINGH, V. THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN INFLAMMATORY REACTIONS. **FEMS immunology and medical microbiology**, v.51,n.3, p443–452, 2007.

TROUVIN, A.-P., & PERROT, S. New concepts of pain. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 3, June, 2019.

VAL, D. R., BEZERRA, M. M., SILVA, A. A., PEREIRA, K. M., RIOS, L. C., LEMOS, J. C., ARRIAGA, N. C., VASCONCELOS, J. N., BENEVIDES, N. M., PINTO, V. P., CRISTINO-FILHO, G., BRITO, G. A., SILVA, F. R., SANTIAGO, G. M., ARRIAGA, A. M., & CHAVES, H. V. *Tephrosia toxicaria* Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: The involvement of the HO-1 pathway. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 9, p. 1280-1289, 2014.

VAL, D.R., CHAVES, H.V., GOMES, F.I.F. *et al.* The semi-synthetic molecule [4",5"] dihydro-obovatin isolated from *Tephrosia Toxicaria* pers reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats. **Med Chem Res.** n. 27, p.1004–1012. 2018

VILE, G. F., & TYRRELL, R. M. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n.20, 14678–14681. 1993.

WAS, H.; DULAK, J.; & JOZKOWICZ, A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. **Current drug targets**, v.11, n.12, 1551–1570. 2010.

WAZA, A. A.; HAMID, Z.; ALI, S.; BHAT, S.A.; BHAT, M.A. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. **Inflammation Research**, India, v. 67, n. 7, p. 579-588, Jul. 2018.

XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **Journal of leukocyte biology**, v.56, p.576–582 , 1994.

YÑIGEZ-GUTIERREZ, A.E.; BACHMANN, B.O. Fixing the Unfixable: The Art of Optimizing Natural Products for Human Medicine. Department of Chemistry. **journal of medicinal chemistry**, Nashville. v.62, n.18. p.8412–8428. Abril, 2019.

ZHAO, X., PARK, S. Y., YANG, D., LEE, S. Y. Synthetic Biology for Natural Compounds. **Biochemistry**. n. 58, 1454–1456. 2019

ANEXO A

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO ESTUDO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS SM-2 E SM-3 OBTIDOS DE *Stemodia maritima* Linn. EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE DOR NA ATM DE RATOS



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Comte. Maurocéllo Rocha Pontes, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Estudo dos derivados semi-sintéticos BS1 e BS2 obtidos de *Stemodia marítima* em ensaio pré-clínico de dor na ATM de ratos**, registrada com o nº **11/18**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 04/12/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/01/2019 até 01/11/2020
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	325
Peso/Idade	180-220 g / 2-3 meses
Sexo	♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 06 de dezembro de 2018.

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA